

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**“DETERMINACIÓN DE ALGUNOS PARÁMETROS EN EL
DIAGNOSTICO DE RESISTENCIA AL VIRUS DE LA MANCHA
ANULAR DE LA LECHOSA EN PLANTAS DESCENDIENTES DE
Carica papaya L. TRANSGÉNICAS”**

**Trabajo especial de grado presentado ante
la ilustre Universidad de los Andes por el
Br. Carlos Andrés Vilera Calzada como
Requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología.**

Mérida-2001



ACTA DEL JURADO EVALUADOR NOMBRADO POR EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES PARA CONSIDERAR EL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE EL BACHILLER:

CARLOS ANDRÉS VILERA CALZADA

EN MÉRIDA, A LOS SEIS (06) DÍAS DEL MES DE MARZO DE DOS MIL UNO (2.001), NOS REUNIMOS LOS PROFESORES: MANUEL DAGERT BOYER (Tutor), MARIA VIELMA y MARÍA MARQUINA, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, QUIENES FORMAMOS EL JURADO NOMBRADO POR EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS PARA ANALIZAR EL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO QUE SOBRE EL TEMA:

"DETERMINACIÓN DE ALGUNOS PARÁMETROS EN EL DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA AL VIRUS DE LA MANCHA ANULAR DE LA LECHOSA EN PLANTAS DESCENDIENTES DE *Carica papaya* L. TRANSGÉNICAS"

PRESENTÓ EL Br. CARLOS ANDRÉS VILERA CALZADA COMO REQUISITO FINAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

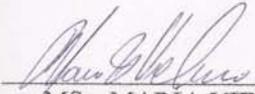
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

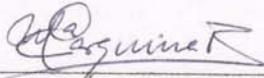
EN LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, ACTO SEGUIDO SE PROCEDIÓ A OIR LA EXPOSICIÓN QUE SOBRE EL TEMA ARRIBA MENCIONADO HIZO EL Br. CARLOS ANDRÉS VILERA CALZADA. DESPUÉS DEL INTERROGATORIO, EL JURADO PROCEDIÓ A DELIBERAR SOBRE LA CALIFICACIÓN DEL TRABAJO SOMETIDO A CONSIDERACIÓN.

FINALMENTE, EL JURADO LO DECLARÓ APROBADO CON UNA CALIFICACIÓN DE DIECIOCHO (18) PUNTOS Y LO RECOMIENDA PARA SU PUBLICACIÓN.

EN FÉ DE LO CUAL FIRMAMOS.


Dr. MANUEL DAGERT BOYER
Tutor


MSc. MARÍA VIELMA


Lic. MARÍA MARQUINA

Este trabajo requisito indispensable para optar al título de Licenciado en Biología, fue realizado en el Laboratorio de Genética y Química Celular (GeQuimCel) de la Universidad de los Andes, bajo la tutoría del Dr. Manuel Dagert.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso, fuente primaria de toda idea y de toda creación.

A mis padres, por su paciencia y apoyo.

Al Dr. Manuel Dagert, cuyos auspicios hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Universidad de los Andes, institución con quien siempre tendré, una deuda de gratitud.

A la Ing. María Marcano y los Licenciados Armando Briceño y Thais Castro, por sus valiosas orientaciones.

A los profesores: María Marquina y María Vielma y Jonh Cruz, por haber aceptado ser parte del jurado.

A los profesores: Gustavo Fermín, Luisana Avilán, Marcos Bastidas, Benito Briceño y Pedro Jiménez, por haberme atendido y haberme brindado oportunas colaboraciones.

Al personal del Laboratorio de Genética y Química Celular, por su compañerismo y tolerancia.

Obedeciendo la palabra, cuando dice: “ al César, lo que es de César “. Al Br. César Garboza por haber obtenido parte del material vegetal usado en este trabajo.

A cualquiera, que de alguna manera hubiere colaborado con la realización de esta tesis, y que por causa de olvido no menciono en este instante, gracias.

DEDICATORIA

Al espíritu que me anima y me guía.

A mi Madre

INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
-------------------	---

I.-Transformación Genética de plantas, **p3**. **II.-** Potyvirus, **p5**. **III.-** El virus de la mancha anular de la lechosa (PRV o PRSV), **p11**. **IV.-** Mecanismos de resistencia a patógenos, **p11**. **V.-** Resistencia a virus en plantas transgénicas para genes *cp*, **p14**. **VI.-** Inestabilidad de marcadores transgénicos, **p15**. **VII.-** Resistencia a kanamicina en plantas transgénicas para *nptII*, **p19**. **VIII.-** Hipótesis, **20**. **IX.-** Objetivos, **p21**.

METODOLOGÍA

Materiales.....	22
-----------------	----

1.-Material Vegetal, **p22**. **2.-** Inóculos Virales, **p23**. **3.-** Cepas y Plásmidos, **p23**. **4.-** Enzimas de restricción, **p24**. **5.-** Marcadores de Peso Molecular, **p25**. **6.-** Reactivos para PCR, **p25**. **7.-** Antibióticos, **p25**.

MÉTODOS

Plan de trabajo.....	26
----------------------	----

1.- Cultivo de plantas, **p26**. **2.-** Infección de plantas con el virus PRSV, **p27**. **3.-** Extracción de ADN genómico, **p27**. **4.-** Extracción de ADN plasmídico, **p28**. **5.-** Purificación de bandas de ADN a partir de geles de agarosa, **p29**. **6.-** “ Polimerase chain reation “(PCR), **p30**. **7.** Obtención de sondas de ADN para *nptII* por síntesis *de novo*, **p31**. **8.-** Hibridación, **p32**. **9.-** Determinación de la concentración de Km a la cual aparecen síntomas (por aplicación directa en condiciones *in vivo*), **p35**. **10.** Asignación de la sensibilidad a kanamicina, **p35**. **11.-** Determinación de la proteína NPTII por ELISA, **P35**.

RESULTADOS.....	p36
-----------------	-----

1.- Sensibilidad a virus, **p36**. 2.- “ Dot blotting ” para la detección de *cp*, **p37**. 3.- “ Southern blotting ” para la detección del gen *cp*, **p38**. 4. Resultados de PCR para la detección del gen *cp* en descendientes transgénicos de lechosa, **p39**. 5.- Determinación de la concentración de kanamicina a la cual aparecen síntomas, **p39**. 6.- Ensayos de ELISA para la determinación de NPTII, **p41**. 7.- Obtención de sondas para *nptII*, **p44**. Hibridación “ dot blotting “ para *nptII*, **p45**

DISCUSIÓNp48

CONCLUSIONES.....p53

BIBLIOGRAFÍA.....p54

ANEXOS.....p68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este trabajo.....	p23
Tabla 2. Enzimas de restricción usadas en este trabajo.....	p24
Tabla 3. Marcadores de peso molecular usados en este trabajo.....	p25
Tabla 4. Reactivos para PCR.....	p25
Tabla 5. Antibióticos usados en este trabajo.....	p25
Tabla 6. Determinación de la concentración de Km (g/ml) a la cual aparecen síntomas por aplicación directa en condiciones <i>in vivo</i> . Fenotipo asignado de resistencia a Km.....	p40
Tabla 7. Resultados de ELISA para la determinación de la proteína NPTII en descendientes de <i>Carica papaya</i> .L transgénicas.....	p42
Tabla 8. Cuadro comparativo de los resultados de la actividad del marcador <i>nptIII</i> en descendientes de lechosa transgénica comparados con descendientes de tabaco transgénico.....	p43
Tabla 9. Cuadro comparativo de los resultados de los diferentes ensayos en descendientes de <i>Carica papaya</i> . L.....	p47

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Membrana de hibridación de " dot blotting "
para la detección del gen *cp* en descendientes de lechosa
y controles respectivos.....p38
- Figura 2.** Southern para la detección de secuencias *cp*
en descendientes transgénicosp39
- Figura 3.** Patron de restricción del plásmido pGA482G
Ser digerido con los enzimas *NcoI* y *BamHI*.....p44
- Figura 4.** Membrana de hibridación para la detección
por "dot blotting" del gen *nptII* en descendientes de lechosa.....p46

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por finalidad la evaluación de una muestra de descendientes de *Carica papaya* L. transgénicas para una versión del gen de la proteína de la capsidie (*cp*) del virus de la mancha anular de la lechosa (PRSV). Se esperaba que esta transformación confiriera resistencia al virus. Se evaluó el comportamiento de *cp* en cuanto a la permanencia en las plantas y en cuanto a expresión comparándolo con el comportamiento de el marcador cotransformante *nptII* que confiere resistencia a Km. Las evaluaciones se realizaron sobre plantas de edad comprendida entre 6 y 8 meses, inoculadas con el virus en condiciones de invernadero durante un periodo de 6 meses. En algunas de las plantas de la muestra se observó resistencia al virus asumiéndose que habrían recibido el marcador *cp* por segregación, esto pudo ser demostrado por la detección de la secuencia *cp* por medio de “southern blotting” y “dot blotting” en aquellas plantas resistentes al virus. La secuencia *cp* se mantubó integrada al genoma de las plantas que lo recibieron durante todo el período de pruebas y de la misma manera la expresión fue constante observándose el mantenimiento del fenotipo resistente luego de la reinoculación de las plantas con el virus. En una de las plantas de la muestra, que representa el 7,14% del total de plantas que recibieron el marcador, aunque recibió el marcador no fue resistente al virus; en las restantes se observó una estrecha correlación entre la resistencia a virus y la presencia del marcador *cp*. El gen *nptII*, mostró gran inestabilidad y no se pudo observar su actividad en ninguna de las plantas; ni en cuanto a la codificación de la proteína recombinante NPTII determinada por ELISA ni en cuanto a la expresión de la resistencia a Km, determinada por un ensayo de resistencia *in vivo*. La causa de esta inestabilidad obedeció en la mayoría de los casos, a la pérdida de las secuencias de este transgen como se demostró con la hibridación “dot blotting” con una sonda específica.

ABSTRACT

The main objective of this work was the evaluation of a sample of descendants of *Carica papaya* L. transgenic for a version of coat protein gene (*cp*) of the “ papaya ringspot virus “ (PRSV). It was expected that this transformation conferred resistance to the virus. The behavior of *cp* as far as its presence in the plants and its expression was evaluated by comparing it with the behavior of the cotransforming marker *nptII*, that confer resistance to kanamycin. The plants were between 6 and 8 months old. These plants were inoculated with the virus under controlled environmental conditions during a period of 6 months. In some of the plants, resistance to the virus was observed, this conducted us to assume that they received the marker *cp* by segregation. Our assumption was corroborated by detection of *cp* sequences for dot blotting and southern blotting. Resistant phenotype was constantly observed even after a new inoculation of the virus on plants. One of plants, which represents 7,14% out of the total sample, even though it received the marker was not resistant to the virus. Among the rest of the plants were observed a good correlation between the resistance to the PRSV and the *cp* gene presence. The gene *nptII* showed great instability and it was not possible to detect its activity in any plant; neither the codification of recombinant protein NPTII, determined by ELISA, nor the expression of the resistance *in vivo*. The cause of instability was mainly due to the loss of the transgene sequences demonstrated with the dot blotting test.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de las técnicas de ingeniería Genética a la obtención de plantas resistentes a virus, es un área en la cual se han logrado grandes avances, los progresos en este sentido se deben en gran medida, a la transformación de plantas con genes virales. Resultados satisfactorios son obtenidos de la transformación tanto con constructos traducibles, no traducibles o antisentido de algunos genes virales como los que codifican para la proteína de la capsidie, y para replicasas o proteasas (Fernández, 2.000; Grumet, 1.995).

La transformación genética de plantas con el gen de la proteína de la cápsidie (*cp*) de virus infectantes, es una tecnología que ha resultado muy eficaz en la obtención de plantas resistentes al mismo virus y en muchos casos, la resistencia es genérica contra distintas cepas del virus, e inclusive puede extenderse a virus relacionados (Fitchen and Beachy, 1.993; Grumet, 1.995). Los mecanismos involucrados en la generación de la resistencia a virus en plantas transgénicas al gen de la capsidie, no son del todo conocidos; las evidencias experimentales de los diferentes casos estudiados sugieren la intervención de varios tipos de mecanismos en la generación de la resistencia. De esta manera, se han propuesto mecanismos por mediación de la proteína recombinante CP y también por mediación del ARN heterólogo producto del transgen. En términos generales, estos mecanismos se basan en que: la resistencia a virus sería la consecuencia de la acumulación en la célula de productos del transgen *cp* (ARN, proteína o ambos); este proceso interfería con las funciones virales o activaría sistemas defensivos antiviral en el vegetal (Grumet, 1.995; Fernández, 2.000; Fermín, 1.996; Yusibov and Loesch- Fries, 1.995). Esta tecnología ha sido ensayada en lechosa, *Carica papaya* L., con miras a la obtención de plantas resistentes al potyvirus,

“ papaya ringspot virus” (PRV o PRSV), virus que representa una fuerte limitante para este cultivo, al originar una enfermedad caracterizada por síntomas persistentes de: disminución del crecimiento de las plantas; deformación, clorosis y reducción de la lámina foliar; presentándose un anillo necrótico característico en el fruto; con la consecuente disminución en rendimiento y calidad de las cosechas. Para PRSV no se conoce resistencia natural en lechosa. Por medio de la transformación genética con el gen *cp* clonado a partir de PRSV, se ha reportado la obtención de plantas transgénicas de lechosa resistentes al

virus; no obstante, esta resistencia por lo general se encuentra limitada a la “ variante geográfica ” a partir de la cual ha sido clonada la secuencia transformante o “ variantes geográficas ” cercanas (Tennant et .al. 1.994). Como parte de un intento por obtener una secuencia del gen de la capsidie de PRV más universal y de efecto de resistencia más genérico Fermín, (1996) clona un grupo de secuencias *cp* provenientes de aislados venezolanos de la zona de El Vigía Edo. Mérida , Venezuela. Una de estas secuencias fue empleada en la transformación de la lechosa de la variedad “Thailandia Roja”. Las plantas transgenicas obtenidas, así como los descendientes F1 mostraron ser resistentes al menos contra aislados del virus provenientes de la zona El Vigía y de San Juan de Lagunillas, Estado Mérida. Estas líneas se espera sean de utilidad agrícola.

Debido a los altos costos de la transformación y regeneración de plantas transgénicas, los cultivos de plantas genéticamente modificadas son establecidas en base a las líneas de descendientes obtenidas a partir de las plantas transgénicas regeneradas; de manera que esta descendencia debe recibir, mantener y expresar eficientemente los marcadores recombinantes. No obstante, las plantas transgénicas, así como su progenie, pueden presentar problemas de inestabilidad de los marcadores recombinantes, originados principalmente por la falta de actividad en los marcadores (silenciamiento) y en menor grado por la pérdida de marcadores u otras causas (Dale et.al., 1.998; De Block, 1993). En los cultivos transgénicos estos fenómenos son frecuentes, al punto que en una encuesta al respecto, 30 compañías dedicadas a la obtención de plantas transgénicas reconocieron haber observado algún tipo de inestabilidad en sus productos (Finnegan and Mac-elroy, 1.994). De manera que para cada nueva línea de descendientes transgénicos potencialmente aprovechables, existe la incertidumbre acerca de su estabilidad, de su capacidad para mantener y expresar eficientemente los transgenes. Es importante estudiar estos aspectos para delimitar la utilidad del cultivo a la par de obtener algunos conocimientos básicos acerca del comportamiento de los sistemas genéticos transformantes en el sistema bajo estudio.

Un aspecto interesante en la biotecnología de plantas transgénicas lo han constituido los genes bacterianos de resistencia a antibiótico. Estos son incorporados en los vectores de transformación, con fines de selección de células y tejidos transformados y para actuar como genes reporteros, funciones para las cuales resultan muy eficientes; además, estos

genes son abundantes en el ambiente, de manera natural; características estas que propiciaron la difusión de su empleo en los vectores de transformación genética vegetal. El gen de la neomicina fosfotransferasa II *nptII* que confiere resistencia a kanamicina es uno de los mayormente empleados (Weide et. al., 1.989; Smalla et. al., 2.000). En las líneas transgénicas así obtenidas, el comportamiento de los marcadores de resistencia a antibiótico con respecto a la segregación, la estabilidad y a la correlación entre su actividad con relación a los otros transgenes cotransformantes ha sido objeto interés (Confalonieri et. al., 1.994; Dinant et. al., 1.993; Weide et. al., 1.989). En la actualidad, la introducción de genes de resistencia a antibiótico en los cultivos transgénicos, es objeto de polémicas, argumentándose la posibilidad de fenómenos de transferencia horizontal de la secuencia génica o de la producción de alergia en humanos de la proteína recombinante (Smalla et. al. 2.000); debido a ello se presenta la disyuntiva entre las ventajas de una selección económica y eficiente de plantas transgénicas, y los posibles riesgos representados por el uso de estos marcadores. En este caso en particular, la variabilidad introducida por la inestabilidad del transgen, tendría un aspecto ventajoso al ofrecer la oportunidad de seleccionar descendencia que no porte, o no exprese el gen bacteriano de resistencia a antibiótico.

I.-Transformación Genética de Plantas

En términos generales, la transformación genética puede definirse como introducción en una célula de una molécula de ADN foráneo.

Los avances en la tecnología del ADN recombinante, que permiten el aislamiento y clonación de genes, así como el desarrollo de sistemas eficientes de transformación de células vegetales, han permitido la aplicabilidad de la transformación genética en plantas de cultivo, con fines de mejoramiento. En la actualidad, más de 50 especies cultivables han sido mejoradas por estas técnicas; este número incluye principalmente dicotiledoneas y algunas monocotiledoneas como maíz, trigo y arroz. A pesar de que esta tecnología es aplicable únicamente en el caso de fenotipos que son determinados por un gen o un grupo pequeño de genes, un número considerable de características deseables han sido introducidos por la transformación genética en plantas de cultivo; entre estos caracteres se

encuentran: resistencia a insectos, resistencia a herbicidas y resistencia a enfermedades: virales, bacterianas y fungosas; tolerancia a metales, regulación de características fisiológicas como: androsterilidad, maduración del fruto; síntesis de proteínas, anticuerpos y otras sustancias de aplicación farmacéutica o industrial (Fernández, 2.000).

La eficiencia de la transformación genética depende de la eficiencia con la cual el ADN es introducido en la célula y de la eficiencia con la cual los vectores son integrados al genoma de la planta características que dependen principalmente del sistema de transformación.

El sistema de transformación genética para plantas dicotiledoneas más eficiente conocido es el de *Agrobacterium tumefaciens*. El género *Agrobacterium* de la familia *Rhizobiaceae* agrupa a bacilos del suelo, gram negativos, que infectan a las plantas dicotiledoneas, coníferas y algunas monocotiledoneas, produciendo enfermedades caracterizadas por la formación de hiperplacias (tumores o callos producidos, por el crecimiento inmoderado del tejido infectado). Se han distinguido tres especies de *Agrobacterium*, de acuerdo a sus características fitopatogénicas, *A. tumefaciens*, que produce agallas de corona; *A. rhizogenes* que produce la enfermedad de la raíz velluda y *A. radiobacter*, que es avirulento. La virulencia en *Agrobacterium* es determinada por la presencia de un factor extracromosomal que en *A. tumefaciens* es denominado plásmido Ti; este plásmido contiene un grupo de genes involucrados en la virulencia (genes Vir), que codifican para proteínas involucradas en la transferencia e integración al genoma de la célula vegetal de un elemento transponible contenido en el plásmido; este elemento es llamado T-DNA por "transfer DNA". Este es un transposón delimitado por secuencias directas repetidas, denominadas derecha e izquierda (Thomashow et. al, 1.980; Watson et. al 1.975). Esta secuencia transferible contiene genes expresables en plantas que codifican para enzimas que participan de la síntesis de hormonas vegetales, estos genes son los responsables de formación de tumores y se llama genes oncogénicos; en este fragmento se encuentran contenidos también, los genes que codifican para la síntesis de sustancias usadas como nutrientes por el bacilo, como la nopalina y otros compuestos nitrogenados que le sirven de reserva.

La capacidad de transferir e integrar eficientemente el fragmento T-DNA en los cromosomas vegetales es utilizada para la construcción de sistemas de transformación que

utilizan al bacilo como vehículo y a los plásmidos de *Agrobacterium*, o más específicamente al segmento T-DNA, como vector de transformación de plantas. En estos vectores de *Agrobacterium*, se han suprimido los genes oncogénicos y se han incorporado marcadores para la selección en bacteria y plantas; sitios de clonaje que permiten introducir los llamados "cassete" de expresión en plantas constituidos por los transgenes con sus respectivas regiones promotoras, secuencias líder y de terminación de la transcripción. Existen muchos vectores de *Agrobacterium*, pero estos corresponden a dos tipos básicos:

- a) Vectores de cointegración, los cuales son contruídos clonando el gen a transferir en fragmento T-DNA, el cual a su vez, se encuentra clonado en un vector de replicación en *Escherichia coli*; una vez replicado en *E. coli* este es transferido a *Agrobacterium* por medio de conjugación. Una vez en *Agrobacterium*, el T-DNA recombinante es integrado al plásmido " salvaje " bien por la recombinación de las regiones homólogas, bien por la formación de cointegrados entre el plásmido usado como vector de clonaje y plásmido nativo de *Agrobacterium*. La selección de aquellas células de *Agrobacterium* en donde se han integrado los Ti recombinantes se efectúa por medio de los marcadores de resistencia a antibiótico presentes en el T-DNA recombinante.
- b) Vectores Binarios, constan de un plásmido " lanzadera ", un plásmido conjugable entre bacterias y capaz de replicarse tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*. Sobre este plásmido lanzadera son clonados los constructos T-DNA en el cual se han insertado los genes a transferir. Una vez clonado en *E. coli* el plasmido es transferido por conjugación a una cepa de *Agrobacterium* portadora de un plásmido Ti carente de genes oncogénicos y de secuencias directas; este plásmido aporta los productos de los genes Vir, que actúan en trans. (Fernández, 2.000).

Existen otros sistemas de transformación genética de plantas; estos encuentran aplicabilidad principalmente en aquellas especies de plantas resistentes a la agroinfección como cereales y otras monocotiledoneas. Entre estos sistemas se citan: transformación por fusión de liposomas, de protoplastos y tejidos, disparo de partículas o biolística, microinyección de ADN en células, macroinyección de ADN en tejidos, incubación directa de embriones o tejidos en soluciones de ADN. (Fernández, 2.000).

La transformación se realiza generalmente en protoplastos, o en explantes de tejido y luego, a partir de estos, son regeneradas nuevas plantas que serán portadoras de los vectores de transformación. El proceso de regeneración se sirve de la totipotencialidad de las células vegetales, en un proceso que involucra la dediferenciación del tejido, y formación de nuevos órganos y plantulas a partir del tejido dediferenciado. Estos procesos son inducidos por el tratamiento con diferentes reguladores del crecimiento vegetal, en condiciones *in vitro*.

II.- Potyvirus

Los potyvirus son el grupo de virus vegetales cuyo prototipo es el "potato virus Y" (PVY), son agrupados dentro del género *Potyvirus* de la familia *Potyviridae*. Constituyen el grupo de virus vegetales más numeroso (30% de el total conocido) con 180 miembros confirmados; estos causan pérdidas significativas en los cultivos agrícolas más importantes (Ward and Shukla, 1991).

El género *Potyvirus* posee las siguientes características:

El virión maduro tiene forma de partícula filamentosa y flexible de simetría helicoidal, de longitud comprendida entre 680-730 nm y diámetro 11-15 nm de longitud. (Dougherty and Carrington, 1988).

Es característico de las infecciones por estos virus la formación de cuerpos de inclusión; estos pueden ser de tres tipos : a) Cuerpos de inclusión citoplásmicos-cilíndricos, que son agregados de la proteína de inclusión cilíndrica (CI), una proteína viral de 70 kDa que posee actividades de ATPasa y helicasa. Los cuerpos de inclusión cilíndricos se observan en todas las infecciones de los potyvirus conocidos, y presentan una forma particular en cada uno, por lo que son de gran valor taxonómico. b) Cuerpos de inclusión amorfo-citoplásmicos, formados por las proteasas virales: Hc-Pro (58 kDa) y P1. c) Cuerpos de inclusión nuclear, formados por cantidades equimolares de VPg, una proteasa viral, y de NIb (58 kDa), una RNA polimerasa ARN dependiente. Aunque el virus expresa las proteínas constituyentes de los cuerpos de inclusión amorfos y nucleares, estos no siempre se forman, por lo que tienen menor valor taxonómico. (Dougherty and Carrington, 1988).

El genoma viral está representado únicamente por una molécula de ARN de alrededor de 10 Kb, simple banda y con polaridad de mensajero (sb ARN+), este ARN posee un único codón de inicio, presenta regiones no traducibles en el extremo 5' y 3'. La región 5' es muy variable dependiendo del tipo de virus, es particularmente rica en residuos de adenina y pobre en guanina, posee además regiones conservadas en distintos potyvirus. La región 3' es también variable, aunque presenta secuencias conservadas de nucleótidos ricos en el par AG, posee estructuras secundarias muy estables y una cola de PolyA variable en longitud (Riechmann et.al., 1992. Citado en Briceño, 1998). El ARN de los potyvirus no presenta el típico agregado CAP en su extremo 5', estando unido covalentemente a la proteína VPg, proteína que se supone suplir las funciones CAP (Carrington and Freed, 1990).

La capsidie de los potyvirus se encuentra formada por la agregación de alrededor de 2.000 unidades de la proteína de la capsidie CP, y no presenta membrana externa (Winterhalter, 2000).

Los potyvirus son transmitidos de manera no persistente por áfidos sin requerir virus auxiliares "helper virus", también, pueden o no, ser transmitidos por inoculación mecánica o contactos planta-planta. (Plant Viruses On Line, 2.000).

La infección viral involucra una suma de etapas, que se citan en el orden como se encuentran mencionadas en Bustamante and Hull, (1998):

1) Entrada en la célula. Para la replicación de los virus, es necesaria su entrada en una célula hospedadora, el proceso de entrada involucra tres fases sucesivas: a) anclaje a la célula, b) penetración o traspaso de la membrana celular y c) deencapsidación (Bio 112, virology, 1999). Los virus vegetales previo a estos procesos deben superar la barrera que representa la pared celular. Los poros de la pared celular son un tamaño inferior al requerido para permitir la libre penetración de los virus vegetales, de manera que sería necesario la existencia de daños en la pared para permitir el contacto de los viriones con la membrana plasmática (Rybicki, 2.000). Se cree, por lo tanto, que la infección ocurre solo a través de heridas en el tejido. Para el caso de virus transmitidos por insectos como los potyvirus, estas heridas son producidas por el ataque del insecto, lo cual, tendría un efecto propiciador sobre la infección, hecho que explicaría que comparativamente se requieran cantidades menores de viriones para producir infecciones efectivas en los virus transmitidos por vectores, comparados con aquellos transmitidos por vía mecánica. (Rybicki, 2.000).

Una vez que los viriones alcanzan la membrana celular se unen a esta por medio la interacción con un receptor de membrana específico para el virus, que permite el anclaje de los viriones a la membrana plasmática. La penetración al interior de la célula tiene lugar por la endocitosis de la partícula viral. (Virus Uncoating, 2.000).

La deencapsidación involucra cambios en la estructura del virión, que originan el desensamblaje de la capsidie. Este proceso podría ser inducido por condiciones iónicas y de pH propias del interior celular o por interacciones con factores del hospedador. Se ignora si el proceso es de deencapsidación es el inverso del proceso de encapsidación (Virus Uncoating, 2.000).

2) La traducción: donde el ARN viral sirve de mensajero para producir proteínas estructurales y no estructurales, sirviéndose del ribosoma vegetal. El proceso de unión del ARN viral a los ribosomas era hasta hace poco desconocido, y aún no está del todo elucidado. Al respecto, se ha postulado que la proteína VPg suplente las funciones de la estructura CAP en la unión al ribosoma del ARN viral; investigaciones recientes en este sentido, en el “turnip mosaic potyvirus”, (TUMV) de *Arabidopsis thaliana*, han permitido demostrar que la interacción entre la proteína VPg con el sitio de reconocimiento en el ribosoma eIF (iso) 4E, se produce de manera análoga a como sucede la interacción de este sitio en el ribosoma con la estructura CAP m (7) Capp N, del ARNm eucariótico (Leonald et.al., 2000). Igualmente, se ha postulado que la región 5' no traducida del ARN actuaría como potenciador de la traducción (Carrington and Freed, 1.990). Estudios en TMV en tabaco (Niepel and Gallie, 1999), y en “ plum pox virus ” (Simon et .al., 1997). Confirman esta hipótesis, habiéndose identificado en TMV regiones potenciadoras “ up stream ” .

El producto de la traducción del ARNsb+ es una poliproteína única, a partir de la cual, por un proceso de autoclivaje, se originan todos los productos del virus. El clivaje es realizado por las proteasas NIa, Hc-Pro y P1, proteínas clasificadas dentro del grupo serinaproteasas, que son capaces de catalizar su propio clivaje por ser activas dentro de la misma poliproteína (Dougherty and Carrington, 1988; Riechmann et. al. 1.992). El autoclivaje es un proceso sometido a regulación de manera que las diferentes proteínas son procesadas de modo diferencial, de acuerdo a los requerimientos de cada una. (Riechmann et. al. 1.992; Kuhlemeier and Zsitlin, 1.992). A continuación describen las

funciones de los diferentes péptidos, en una descripción adaptada a partir de Winterhalter, (2.000):

P 1: Proteasa del tipo serínproteasa. Participa en el transporte del virus en la planta.

Hc- Pro: Componente ayudador “ Helper component ”; interviene en la trasmisión por áfidos, en la replicación del ARN viral y el transporte del virus.

P3: de función desconocida (Posible papel en la replicación).

CI: Proteína de inclusión cilíndrica, posee actividad helicasa sobre ARN heteroduplex. Participa en el movimiento entre células del virus.

6 K₁ y 6 K₂: péptidos 6 kDa de función desconocida. Posible papel en la replicación y transporte del virus.

NIa: proteína de inclusión nuclear NIa presenta dos dominios, uno proteasa en el extremo C- terminal y otro VPg en extremo N- terminal.

NIb: proteína de inclusión nuclear replicasa RNA dependiente.

CP: proteína de la capsidie. Tiene, además, un papel activo en el movimiento célula a célula de el virus y en la activación del genoma.

3) Replicación del ARN viral: esta etapa es efectuada en una reacción de RdRp (RNA dependent RNA polymerase) y comprende dos pasos: a) Síntesis de la cadena negativa usando al sbARN + como molde. b) Síntesis *de novo* de sb ARN + usando la cadena negativa como molde (Bustamante and Hull, 1.998).

La proteína NIb ha sido postulada como la replicasa ARN dependiente que cataliza el proceso de replicación en los potyvirus. Los estudios de mutantes defectivos y de afinidad entre proteínas, indican que en los potyvirus el complejo de replicación se forma por la

intervención de proteínas codificadas por el mismo virus, existiendo evidencias de la intervención de las proteínas P1, P3, VPg, NIa, (Merits et .al., 1.999; Wang et .al., 2000; Daros et. al., 1999). Asimismo, se ha señalado que la replicación depende del péptido o 6Kda₁ codificado por el virus, este tiene propiedades de interacción con el retículo endoplasmático. (Schaad . et. al., 1.997); esta organela se encuentra asociada a la síntesis *de novo* del ARN viral en PPV y TEV (Martin et.al., 1.995; Schaad et .al., 1.997). Además de las proteínas virales, intervendrían en la replicación, proteínas del hospedador. En el potyvirus “ zucchuni yellow mosaic virus ” (ZYMV) infectando en *Cucumis sativus*. L.; se demostró por medio de la técnica de los dos híbridos, la interacción entre la RNA polimerasa viral y una proteína del hospedador involucrada en la interacción el ARN, la “ polyA binding protein ” (PABP) (Wang et. al., 2000).

4) Transporte y encapsidación Los mecanismos involucrados en la movilización de los potyvirus permanecen sin elucidar. Este grupo no figura dentro de los virus para los cuales ha sido reportada la movilización en forma de virión maduro (Xiong, 2.000). Se cree que la movilización de los potyvirus ocurre de manera análoga a la movilización del “ tobacco mosaic virus ” (TMV), que involucra la formación de complejos de ribonucleoproteína, que son movilizados a corta distancia, célula a célula, a través de los plasmodesmos, y a larga distancia a través de los haces vasculares (Carrington et. al., 1.996; Xiong, 2.000). El hecho de que en algunos potyvirus la proteína P1 necesaria para el transporte guarde gran similitud con la proteína del transporte del “ tobacco mosaic virus ” (Riechmann et. al., 1.992) sería una prueba de la analogía entre los procesos transporte de TMV y los potyvirus.

Varias proteínas virales han sido asociadas al movimiento de los potyvirus. Las evidencias provenientes del estudio de mutaciones indican que las proteínas CP, Hc-PRO y P1 tienen participación activa en el movimiento entre células (“cell to cell”), via los plasmodesmos (Andrejeva et. al., 1.999). La proteína CP acompaña al movimiento de los viriones en el retículo endoplasmático (Roberts et. al., 1.998), pero no se tienen referencias de si la encapsidación del virus ocurre antes, durante o después del tránsito por los plasmodesmos. La proteína CP es también requerida para la movilización a larga distancia a través del floema; su extremo N-terminal estaría involucrado en el transporte célula a célula y su dominio "core" en la movilización a larga distancia (Carrington et. al

1.998). Las proteínas VPg y el péptido 6Kd₂ han sido asociados también al transporte del virus (Rajamaki and Valkonen, 1.999); la primera tendría participación en el transporte célula-célula. La proteína CI participa del movimiento célula a célula, su modo de acción es desconocido, sin embargo, se sabe que interacciona con parte externa del retículo endoplasmático, y que sus funciones estarían mas relacionadas con la disminución de calosa en torno al retículo endoplasmático que con interacciones con CP o la pared celular (Roberts et. al 1.998). En el TMV, las funciones de la proteínas de transporte, MP y CP involucran el relajamiento y aumento en diámetro de plasmodesmos (Carrington et.al., 1.996). No se conoce la forma como los potyvirus logran penetrar o escapar del floema, aunque se cree que estos movimientos tendrían relación con la formación de nuevas hojas (Xiong, 2.000).

La transmisión por áfidos requiere de la interacción sinérgica de las proteínas CP y HC-pro. Esta última sería recibida por el insecto conjuntamente con el virión (Xiong, 2.000(b); Riechmann et. al, 1.992).

III.- El virus de la mancha anular de la lechosa (PRV o PRSV)

El PRSV es un potyvirus típico. Algunas de sus características son: virión de forma filamentosa y usualmente flexible de 760 –800 ηm de largo y 12 ηm de grosor y una densidad de 1,32 g/cm³, en CsCl. Cuerpos cilíndricos presentes en todas sus infecciones.

Los viriones tienen un contenido de proteína de 94,5% y 5,5% en ácidos nucleicos, siendo de 12 Kb la longitud total del genoma.

Se conocen dos cepas no diferenciables inmunológicamente, pero si por su rango de hospedador, la Cepa P infecta lechosa y cucurbitáceas y Cepa W infecta cucurbitáceas pero no lechosa.

Es transmitido de manera no persistente por los áfidos, *Myzus persicae* y *Aphis gossypii*; también por vía mecánica (Purcifull et.al., 1.984).

IV.- Mecanismos de resistencia a patógenos

Las plantas continuamente están expuestas al ataque de patógenos, que incluyen virus, bacterias, hongos y nemátodos. Paralelamente, los vegetales han evolucionado hasta desarrollar mecanismos que les permiten defenderse ante el ataque de los diferentes patógenos a los que se ven expuestos. Estos mecanismos, en principio están representados por barreras mecánicas como: la pared celular, cutícula y súber y por barreras de tipo químico representadas por algunos de los productos secundarios que son producidos de manera constitutiva. Estas barreras preexistentes ofrecen alguna protección ante los patógenos, sin embargo, son las respuestas inducidas por la infección, los mecanismos que predominantemente contribuyen a la resistencia (Taiz and Zeiger, 1.998).

Una respuesta inducible comúnmente observada en las plantas, ante el ataque de patógenos, es la respuesta hipersensible (HR). La HR se caracteriza por la apoptosis celular, con el rápido desarrollo de lesiones necróticas en el punto de infección (Kenn, 1.992; Staskawicz et al., 1.995; Taiz and Zeiger, 1.998). La acumulación de radicales de oxígeno reativo como (O_2^{-2}) (H_2O_2) y el radical hidroxil (OH^{\cdot}) es característico de los puntos donde tiene lugar la respuesta hipersensible, su formación es catalizada por oxidasas NADPH dependientes, localizadas en la membrana plasmática, que son activadas por la cadena de señales inducida por la infección. Las especies de oxígeno reducidas propician la muerte celular y a la vez tienen efecto antimicrobiano (Taiz and Zeiger, 1.998)

La inducción de la respuesta hipersensible ante patógenos ha sido explicada por teoría de gen a gen de Flor's. (Enyedi et. al., 1992; Kiraly et al., 1972). El postulado de esta teoría consiste en que, por cada gen de resistencia (R) en el hospedador (planta) existe un gen correspondiente que condiciona la patogenicidad en el parásito llamándose a este gen de avirulencia (avr). La inducción de la respuesta en la planta es iniciada por el reconocimiento, por parte de los receptores de la planta, de moléculas específicas, producidas por el patógeno, denominados buscadores o elicitores. Los receptores son codificados por los genes de resistencia (R) y las moléculas del patógeno reconocidas por estos receptores son codificadas por los genes (avr.) (Thomson and Burdon, 1992; Staskawicz et .al., 1995).

Se ha asociado la HR a la activación de otras respuestas defensivas en la planta, caracterizadas por la activación de sistemas de transmisión de señales, la acumulación de reguladores hormonales y la activación de genes específicos de resistencia, con la consecuente producción de proteínas asociadas a la resistencia (PR) y de sustancias antimicrobianas. Se han identificado dos de estos mecanismos, diferenciándose ambas rutas, además de los reguladores hormonales y rutas de transmisión de señales que involucran, por el hecho de que cada una proporciona un rango de protección distinto contra determinados patógenos y la planta es capaz de activar diferencialmente cada uno, dependiendo del tipo de patógeno. (Kachroo et. al., 2.000; Van Wees et. al., 2.000; Silva et. al., 1.999; Taiz and Zeiger, 1.998).

Uno de estos mecanismos conocido como “ induced systemic resistance ” (IRS), involucra la acumulación de jasmonatos y etileno, compuestos que parecen actuar de manera concertada en la activación de genes de defensa (Van Wees et. al., 2.000). Los jasmonatos son producidos a partir del linnoneno; esta ruta metabólica es catalizada en sus primeras etapas por la lipooxigenasa, enzima clasificada como una PR. (Taiz and Zeiger, 1.998). Los jasmonatos median en la producción de muchas PR que han sido denominadas PR básicas.

Otra respuesta asociada a la HR es la denominada “ systemic acquired resistance ” (SAR), mecanismo sistémico y de amplio espectro que confiere resistencia contra diversos patógenos, generando un estado de inmunización no específico (Ryals et. al., 1996; Ward et. al., 1991). Esta respuesta es mediada por ácido salicílico (SA), de lo cual existen numerosas evidencias como: a) El incremento de SA en los tejidos que manifiestan SAR. b) La aplicación de SA induce la expresión de genes SAR, así como la inducción de esta respuesta de la misma manera que ocurre en plantas inoculadas con patógenos avirulentos para SAR. c) Plantas transformadas con el gen de la salicílico hidroxilasa son incapaces de generar SAR. Es clara la importancia de SA en la generación de esta respuesta; sin embargo, los mecanismos por los cuales se induce la acumulación del SA, así como su modo de acción permanecen desconocidos (Taiz and Zeiger, 1.998; Delaney et. al., 1.994).

La respuesta SAR origina la activación de numerosos genes; entre las respuestas que desencadena se encuentra la producción de necrosis de las zonas infectadas y la producción de PR conocidas como proteínas ácidas.

La mayoría de los reportes experimentales coinciden en la existencia de una interacción de tipo negativo entre los jasmonatos y el SA y sus análogos funcionales (Niki et.al 1.998); observándose, generalmente, la supresión en la expresión de genes JA dependientes por la aplicación de SA, posiblemente por el efecto en la supresión de la síntesis de jasmonatos. Sin embargo, experiencias recientes (Van Wees et. al., 2000) señalan que, en *Arabidopsis*, ambos sistemas (SAR e ISR) pueden ser compatibles y la inducción simultánea de ambos genera un mayor rango de resistencia, propiedad que se correlacionaría con el hecho de que ambas vías de respuesta comparten un transductor común en sus etapas tempranas.

Se han distinguido respuestas de resistencia que son independientes tanto del SA y sus análogos funcionales, así como de jasmonato y sus análogos funcionales; por lo cual se sugiere que obedecen a sistemas de transducción distintos a los involucrados en SAR e ISR, como ejemplos están los siguientes:

◆ En tabaco, el gen *topxN1* codifica para una peroxidasa clase III (PR); que es inducida por las lesiones mecánicas y la infección con el “ necrotizing virus ”, sin embargo, la aplicación de SA no suprime su inducción, como sucede con otras respuestas inducidas por lesiones. La aplicación de metil jasmonato o sus análogos tienen efecto inhibitorio sobre la inducción de *tpoxN1*, que solo es inducido por la espermina (Hiraga et. al., 2.000).

◆ El gen CEVI-1, que codifica para una peroxidasa del tomate, no es inducido por los inductores de SAR e ISR, al contrario su inducción parece correlacionarse con defectos en la percepción de auxinas (Mayda et. al., 2000).

Se conocen algunas respuestas por medio de las cuales la planta puede controlar infecciones virales. En *Arabidopsis* y tabaco, que son quizás, las plantas en las que mayormente se han estudiado los sistemas inducibles de defensa; las evidencias indican que el mecanismo SAR se encuentra involucrado en la resistencia a virus (Kachroo et .al., 2.000; Siegrist et. al., 2.000). Por medio de SAR la planta puede controlar infecciones localizadas a través de la inducción de una rápida necrosis del área infectada, pero es incapaz de controlar infecciones sistémicas o atenuar síntomas.

El silenciamiento génico constituye una defensa antiviral (Voinnet et. al. 1.999; Matzke et. al. 2.000). No obstante, no se disponen de referencias que correlacionen esta respuesta, con algún sistema inductivo.

V.- Resistencia a virus en plantas transgénicas para genes *cp*

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la resistencia a virus observada en las plantas transgénicas a *cp*.

En plantas de tabaco transgénicas para el gen de la capsidie de TMV, la resistencia al virus requiere de la acumulación de la proteína CP, y la resistencia es proporcional a la cantidad de proteína acumulada (Farinelli and Mainoë, 1.993), en otros casos la proteína es requerida pero no existe correlación entre las cantidades de esta y el grado de resistencia (Reimann, 1.998). Se sugiere que la acumulación de proteína podría inhibir los procesos tempranos del ciclo viral, como la deencapsidación o la penetración del virus (Beachy, 1993; Grumet, 1.995). En plantas de tabaco transgénicas al gen *cp* del TMV, se ha logrado demostrar que la acumulación de proteína interfiere con la deencapsidación. No obstante, la resistencia así generada por esta transformación es localizada y no impide la movilización célula a célula del virus (Beachy, 1.999).

Constructos no traducibles contentivos del gen *cp*, son capaces de conferir resistencia a virus, por lo cual se considera que los ARN codificados por el gen *cp* tendrían un papel fundamental en la generación de esta resistencia a virus (Dougherty et. al., 1.994; Goodwin et. al., 1.996; Smith et. al., 1.994). La resistencia mediada por ARN, involucra el silenciamiento genético y la cosupresión de los ARN virales conjuntamente con los ARN heterólogos, observándose en este caso, tasas de acumulación muy bajas del ARN heterólogo, en plantas que manifiestan resistencia (Dougherty et. al., 1.994; Ingelbrecht et. al., 1.994 ; Goodwin et.al 1.996; Smith et.al., 1.994).

A los sistemas defensivos de la planta se les asigna una participación importante en la generación de la resistencia a virus en plantas transgénicas a *cp* (Reimann et. al., 1.998; Yusibov and Loesch-Fries,1.995). Los productos del gen *cp* transformante, actuarían como elicitores en la activación de estas respuestas, su acumulación facilitaría el superar el umbral de concentración necesario para generar respuesta de un modo rápido. Existen

observaciones experimentales en *Arabidopsis* que sustentan la idea de CP como inductor de la respuesta hipersensible; se ha encontrado que la resistencia al “turnic crinkle virus” (TCV) depende de la interacción de la proteína CP del virus con una proteína de la planta, denominada TIP (“TCV-interacting protein”) perteneciente a la familia de proteínas NAC, proteínas involucradas en la regulación de la floración y el desarrollo embrionario. Esta interacción fue demostrada por medio de la técnica de los dos híbridos, lográndose identificar una región de TIP responsable de la interacción con CP. La mutación de esta región produce plantas en donde no se genera la respuesta hipersensible ante la infección de TCV. (Ren et. al., 2000).

El conjunto de mecanismos propuestos conduce a la idea de que el nivel de resistencia a virus observado en las plantas transgénicas puede ser la consecuencia de varios tipos de mecanismos o de las diferentes combinaciones entre ellos. Esto concuerda con el hecho de que el grado de resistencia varía con la transformación y con la especie.

VI.- Inestabilidad de marcadores transgénicos

La inestabilidad de los marcadores recombinantes en las plantas transgénicas puede ser causada por el silenciamiento de marcador, pérdida del transgen, arreglos secundarios del marcador; y también por variaciones en la ploidía (De block, 1993).

El silenciamiento es definido como la supresión estable aunque reversible de la actividad del transgen. Se encuentra correlacionado con la presencia de regiones de ADN endógenas, homólogas al gen silenciado, y con frecuencia, aunque no siempre a la metilación de la secuencia silenciada (Dehio and Schell, 1994). Se han distinguido dos tipos de silenciamiento, el silenciamiento genético transcripcional (TGS) y el silenciamiento genético post transcripcional (PTGS).

El TGS es definido como la inactivación de síntesis de ARN de un gen en particular. (Wassenegger and Pélissier, 1998). Este silenciamiento guarda relación con loci silenciadores, estos corresponden a regiones de ADN que presentan homología con las secuencias promotoras del gen silenciado. Se propone que el apareamiento ectópico entre los loci silenciador y las secuencias promotoras, produce arrollamientos irregulares de cromátidas e inducción de la metilación de la secuencia promotora y las adyacentes, lo cual

origina un declive en la tasa de transcripción a partir de ese promotor. (Meyer, 1.996; Wassenegger and Pélissier, 1.998).

El PTGS se caracteriza por la supresión de la actividad del gen aún en presencia de transcripción, proceso que generalmente es acompañado de metilación de la secuencia silenciada, aunque en ocasiones puede no ocurrir metilación. En este tipo de silenciamiento se observa la acumulación de transcritos en el núcleo, mas no en el citoplasma, concluyéndose que existe degradación específica en el citoplasma de los transcritos del gen silenciado (Dehio and Schell, 1.994).

El PTGS al igual que el TGS es explicado en función de la existencia de loci silenciadores con homología con la secuencia silenciada, en este caso con las secuencias codificadoras del gen. Los apareamientos ectópicos y la metilación originarían la codificación de mensajeros aberrantes, que serían reconocidos como extraños y degradados conjuntamente con los ARN homólogos a estos de una manera específica. Otro modelo atribuye el PTGS en plantas transgénicas, al reconocimiento y procesamiento de los ARN aberrantes o de los mARN por parte de polimerasas ARN dependientes, proceso que, en el último caso, sería disparado por el exceso de mARN producto del transgen; los ARN doble banda producidos desencadenarían el proceso de degradación específica de ARN (Wassenegger and Pélissier, 1.998).

La clonación de loci silenciadores ha conducido a la identificación de secuencias homologas al gen silenciado, éstos en las plantas transgénicas siempre están organizados como secuencias invérsas repetidas . Asimismo los ensayos experimentales de protección ante nucleasas de la secuencia silenciada y observaciones del microscopio electrónico, indican la existencia de arrollamientos irregulares de cromátidas en los casos de silenciamiento (Van Blocklandt et. al 1.997; Ye and Signer, 1.996), estas observaciones constituyen evidencias a favor del modelo ectópico como explicación para los fenómenos de silenciamiento génico de plantas transgenicas. Por otra parte, en *Neurospora* se han identificado proteínas relacionadas con el silenciamiento que guardan una estrecha homología con polimerasas RNA dependientes y ADN helicasas; y en *Arabidopsis* se ha identificado el locus SDE1 relacionado con el silenciamiento de transgenes, y que guarda homologia con los RNA polimerasas ARN dependientes de *Neurospora* (Fagard et.al.,

2.000). Estas observaciones, son congruentes con la existencia de un proceso de RdRP en la generación del silenciamiento genético.

Un punto coincidente en todos los modelos para el silenciamiento PTGS, es que se postula la existencia de sistemas citoplasmáticos encargados de degradar de manera específica ARN reconocidos como extraños. En alga *Chlamydomonas reinhardtii* se han identificado un gen

(mut6) asociado al silenciamiento, que guarda estrecha similitud con los de RNA – helicasas, proteínas involucradas en la degradación de ARN (Wu-Scharf et. al., 2.000). En *Arabidopsis*, se han identificado varios loci que podrían corresponder a los de RNAasas involucradas en el silenciamiento (Meins, 2.000).

Experimentos y revisiones recientes Mette et. al., (2.000), señalan que el silenciamiento de los marcadores transgénicos estaría mediado principalmente por ARN doble banda (dsRNA), producidos en el núcleo a partir de los loci silenciadores (secuencias inversas repetidas del mismo transgen); estos ARN doble banda son degradados en fragmentos de aproximadamente 23 nucleótidos. Los fragmentos así producidos, actuarían como inductores de la degradación específica de ARN en el citoplasma. De acuerdo a la misma referencia, la metilación de las secuencias silenciadas ocurre por medio del mecanismo de RdDM (“ RNA directed DNA methylation ”), proceso que involucra la interacción de ARN homólogos con el ADN, interacción que desencadena la metilación específica de citosinas. Igualmente, estos autores (Mette et. al., 2000), sugieren que algunos casos de silenciamiento TGS podrían al igual que PTGS ser producto de la formación de ARN doble banda. Proponen además, que los ARN producidos en el citoplasma por polimerasas RdRp, simulan el modo de acción de moléculas de ARN doble banda producidas en el núcleo.

Otra causa del silenciamiento observable en marcadores transgénicos podría residir en la inestabilidad de los promotores, a partir de los cuales son expresados. Para el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor, ampliamente usado en las transformaciones genéticas vegetales, se ha reportado que puede presentar recombinaciones ilegítimas con promotores de otros virus (Morel and Tepfer, 2.000). Este fenómeno podría simular al silenciamiento TGS del transgen por pérdida de secuencias activas de su promotor.

En las plantas transgénicas es frecuente, que la proporción del fenotipo silente sea igual a la proporción del fenotipo no silente. El fenotipo silente es determinado por factores de tipo genético, representados por los loci de silenciamiento; estos genes determinarían la producción de algún factor inductor del silenciamiento necesario para el establecimiento de la condición silente. Estos factores inductores son acción sistémica, inicialmente son producidos en algunas células ubicadas en aquellas partes de la planta en donde se produce inicialmente el silenciamiento y luego son exportados hacia otras células y tejidos, estableciendo la condición silente en toda la planta. De la misma manera, la transmisión de estos factores inductores de silenciamiento desde los progenitores silenciados hasta la descendencia, puede originar descendientes silenciados, aún en ausencia de los genes de silenciamiento (Meins, 2.000).

Las condiciones ambientales juegan un papel importante en la inducción del fenotipo silente (Meins, 2.000). El efecto de las interacciones ambientales en el desencadenamiento del silenciamiento ha sido bien estudiado en petunia transgénica al gen *Al* del maíz, que confiere coloración rojo salmón en las flores. En ensayos de campo con 30.000 plantas transgénicas, se observó inicialmente el desarrollo de flores rojas, pero luego de un periodo de fuerte iluminación y altas temperaturas, se observó la pérdida de la coloración en las flores, encontrándose fuerte metilación en el promotor transgénico (Dale et. al., 1.998). En los transgenes expresados a partir del promotor de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium* (*pnos*), se ha evidenciado la influencia de los factores ambientales y de fitohormonas sobre su tasa de expresión. La expresión a partir de este promotor, en tabaco es influenciada por auxina, SA y JA (Kim et.al., 1.993; An et. al., 1.990). De manera que la expresión de aquellos genes gobernados por *pnos* estaría fuertemente condicionada por factores ambientales y hormonales.

Las mutaciones defectivas de PTGS, por lo general originan plantas hipersensibles a los virus, por lo cual se cree que el PTGS pudo haber evolucionado como un mecanismo antiviral; convirtiéndose en un sistema muy eficiente en la supresión de la expresión de secuencias extrañas de ADN, incluyendo a los transgenes (Morel and Vaucheret, 2000; Matzke et. al 2.000). En plantas transgénicas a *cp*, este mecanismo actuaría como mediador de la resistencia al virus, al producirse la eliminación conjunta de los ARN codificados por el transgen y ARN virales, en un proceso de cosupresión.

En los virus, a su vez, han surgido mecanismos anti PTGS. En potyvirus, se ha identificado un factor supresor del silenciamiento post transcripcional (PTGS), que actúa de manera sistémica y esta constituido por las proteínas Hc -pro y P1 (Kasschau and Carrington, 1.998; Marathe et .al., 2.000).

En el silenciamiento es característico la pérdida de la actividad de los transgenes, pero es posible detectar la secuencia de estos por medio de técnicas moleculares de PCR o hibridación. En algunos casos se observa la pérdida de la actividad de los transgenes, sin que sea posible su detección por medio de técnicas moleculares; se habla entonces de **inestabilidad por la pérdida de marcador transgénico**, las causas de este fenómeno permanecen desconocidas; éste puede presentarse y durante la regeneración por medio de callos (Risseeuw et.al., 1.997), durante el crecimiento o la formación del embrión siendo frecuente observar que una porción de los descendientes F1 o F2 han perdido el transgen (Kim et. al., 1.998; Risseeuw et . al., 1.997 ; Russell et.al., 1.992). El porcentaje de pérdida puede ser elevado, reportándose 20% en callos de *Nicotiana plumbaginifolia* transgénicos al gen GUS (Risseeuw et. al., 1.997); 10-30% en zanahoria y 40-60% en patilla transgénica a *nptII* (Kim et. al., 1.998).

El gen *nptII* es susceptible a la pérdida de sus secuencias, observándose en *Nicotiana* la tendencia a la inserción de copias truncadas (Gheysen, 1.990), hecho que tendría relación con la tendencia a la recombinación ilegítima de este gen. En tabaco transgénico para *nptII*, se ha observado la formación de mutantes defectivos que presentan delecionada una gran porción central. La transformación de estos mutantes con vectores que contengan este fragmento, origina con frecuencia plantas en donde se restituye la actividad del transgen (De Groot et.al., 1.994).

VII.- Resistencia a kanamicina en plantas transgénicas para *nptII*

El gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) de Tn 5, es ampliamente empleado en las transformaciones genéticas vegetales como gen reportero y de selección de transformantes. La enzima NPTII codificada por este gen, cataliza la tranferencia de un grupo fosfato a la molécula de antibióticos amino-glucósidos como kanamicina, neomicina, y G-418. La actividad de este reportero puede detectarse por ensayos inmunológicos de la

proteína o por determinación de la actividad enzimática (Horsch et. al., 1.984; Weide et. al., 1.989). Como criterio de transgenicidad se toma también la menor sensibilidad a kanamicina de explantes y plántulas transgénicos con respecto a controles normales en condiciones *in vitro*. Se han ensayado pruebas de sensibilidad a la kanamicina por aplicación directa *in vivo* sobre el follaje de plántulas, encontrándose concordancia entre el grado de resistencia a Km en plantas transgénicas y el resultado positivo de pruebas moleculares de detección de la proteína NPTII. (Weide et. al., 1.989).

En un ensayo en plantas de tabaco transgénicos (Observaciones personales, no publicadas) en donde se comparó el grado de resistencia a Km por aplicación directa *in vivo* con el resultado de ELISA para NPTII, se observaron resultados similares a los obtenidos en tomate por Wiede et .al., (1989).

VIII.- Hipótesis

Algunos de los descendientes de lechosa transgénica al gen *cp*, mostraron resistencia ante la inoculación con aislados del virus PRV; dado que en lechosa no se conocen formas de resistencia natural para este virus, se asume que la resistencia observada es consecuencia de la herencia del gen *cp* hasta la descendencia. Entonces, sería posible correlacionar la observación de resistencia a virus, con la presencia del gen *cp* en las plantas resistentes. Esta correlación existiría mientras no incidan factores de inestabilidad que anulen la actividad del gen .

En los progenitores transgénicos se observó actividad *nptII* (resistencia a Km y codificación de la proteína NPTII). Dado que los marcadores *cp* y *nptII* se encuentran sobre el mismo vector de transformación, deberían de presentar ligamiento; por lo tanto, de no existir factores de inestabilidad sobre estos marcadores , debería observarse correlación entre la presencia y actividad de un marcador con respecto a otro.

No se tienen referencias acerca de casos severos de silenciamiento o pérdida de la secuencias de genes *cp*, por lo que es de esperar que en el caso estudiado *cp* tienda a ser estable. Con respecto a al gen *nptII*, es conocida en otros sistemas su tendencia al silenciamiento y pérdida de secuencias por lo que es de esperar, que en el sistema estudiado

esta tendencia también se manifieste, lo que permitiría la selección de plantas no portadoras de este gen.

IX.- Objetivos

Generales:

Estudiar la estabilidad de los marcadores recombinantes, a la vez establecer la correlación entre la detección y actividad de cada marcador y entre marcadores; para una muestra de descendientes de lechosa transgénica a *cp* y *nptII*, en condiciones de invernadero, y una edad comprendida entre 6 y 8 meses y previamente inoculadas con el virus PRV.

Específicos:

Realizar ensayos de detección del gen *cp*, por la técnica de "polimerase chain reaction" (PCR) y por medio de la técnica de hibridación de " dot blotting " con sondas específicas.

Realizar ensayos de detección del gen *nptII*, por la técnica de hibridación " dot botting " con sondas específicas.

Observar y registrar el grado de resistencia a virus

Determinar la resistencia a Km por la técnica de aplicación directa *in vivo* .

Ensayar la actividad ELISA para la proteína NPTII.

METODOLOGÍA

Materiales:

1. **Material Vegetal:** Corresponde a plantas de lechosa de la variedad "Thailandia Roja", obtenidas a partir de los parentales transgénicos desarrollados por el laboratorio Gequimcel de la Universidad de los Andes. Se emplearon dos líneas de descendientes: una derivada de un cruce por autofecundación de una planta hermafrodita y otra línea obtenida por la fecundación de una planta femenina con polen de una planta masculina, las plantas de esta última línea son las identificadas como: P1, P2, P3, P4, P21, P22, P23, las restantes corresponden al cruce hermafrodita.

Como controles se emplean plantas de lechosa no transformadas, inoculados y no inoculados con el virus PRV, éstos fueron obtenidos a partir de semillas suministradas por la estación del FONAIAP de San Juan de Lagunillas Edo. Mérida, estas plantas control fueron cultivados conjuntamente con los descendientes transgénicos. También fueron usadas como controles, plantas no transgénicas de lechosa de la variedad "Thailandia Roja", provenientes de plantaciones del centro del país las cuales se encontraban en un estado de desarrollo equivalente al de los descendientes transgénicos.

Como referencia, en algunos ensayos son usadas plantas de tabaco transgénicas o sus descendientes, estas plantas de tabaco transgénico eran portadoras del mismo vector pGA482G usado para transformar lechosa. Como controles no transgénicos en tabaco se usan plantas de la misma variedad derivadas de semillas obtenidas de la misma plantación de la cual provino la planta isogénica de tabaco.

Las transformaciones genéticas con la secuencia *cp* en los parentales de lechosa y tabaco se efectuaron con la versión de *cp*, de la cepa de PRV denominada "El vigia", que provino de dicha localidad y fue clonada por Fermín, (1996). Las transformaciones se realizaron con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* c58/ pGA482G/ cpVE-1; esta cepa es derivada de la cepa c58/ pGA482G, proveniente de Departamento de Patología de Plantas de la Universidad de Cornell. Esta cepa es portadora del vector de transformación pGA482G, las características de este vector se encuentran reseñadas en Fermín (1996). Como detalles de interés cabe mencionar que el vector transformante corresponde a un

vector binario, derivado Ti de *Agrobacterium* carente de genes oncogénicos, lleva en su sitio *Hind*III el

" cassette " de expresión pUC18cpexpress en donde las secuencia *cp* clonadas por medio de los primer' s JLS-85, JLS-86 pueden clonarse en el sitio *Nco*I de dicho " cassette " de tal manera que quedan en fase con el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CAMV) y aguas abajo de la secuencia " lider "del virus del mosaico de la alfalfa. El plásmido pGA482G es portador del gen *nptII* de Tn5, este se encuentra bajo el control del promotor de la nopalina sintetasa.

2. Inóculos Virales: Se usaron inóculos de PRV provenientes de plantas infectadas de las zonas de El Vigía y San Juan de Lagunillas.

3.Cepas y Plásmidos

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este trabajo

Cepas de <i>E.coli</i>	Características resaltantes	Procedencia
DH5- α	supE44 Δ lac169(ϕ 80LACZ Δ m15) hsdR17 rec A1 GYRA96 TRI-1	ATCC. Mantenido y replicado en el cepario de Gequimcel
Plásmidos		
pUC19	2,6 kB, AP ^R , posee un sitio de clonación múltiple dentro de el gen LacZ.	Promega. Transformado en la cepa de E. Coli DH5- α , preservado en la colección de Gequimcel.
pUC19 <i>cp</i> +	Plásmido pUC19, que lleva clonado en el sitio <i>Hind</i> III el cassette de expresión que contiene a <i>cp</i>	Gequimcel
pGA482G	15 Kb (aproximadamente), Gn ^R , Tc ^R , Nos-npUT CMV(WL)	Aportado por El Dr. Marc Fuchs. Departamento de Patología de Plantas. Universidad de Cornell. N. Y. USA.

5. Marcadores de Peso Molecular

Tabla 3. Marcadores de peso molecular usados en este trabajo

Marcador	Procedencia
1Kb DNA ladder	Promega
ADN λ digerido con <i>psfI</i>	Gequimcel

6. Reactivos para PCR

Tabla 4. Reactivos para PCR

Material	Características	Procedencia
Taq DNA Polimerasa		Gequimcel
Nucleótidos	100 mM	Promega
Buffer 10X	50Mm,KCl ₂ , 100mM Tris-Cl(pH9@25°C)1% Triton	Promega
MgCl ₂	25mM	Promega

7. Antibióticos

Tabla 5. Antibióticos usados en este trabajo

Antibiótico	"stocks"	Concentración Utilizada
Ampicilina	50 mg/ml en agua	50-100 mg/l
Tetraciclina	50 mg/ml en etanol	12 mg/l
Gentamicina	40 mg/ml en agua	40 mg/l
Kanamicina	250 mg/ml en agua	Variable

METODOS

Plan de trabajo

Para realizar los diferentes ensayos que constituyen los objetivos de este trabajo, se sigue el esquema siguiente:

Se evaluó inicialmente la resistencia al virus PRV en los descendientes y controles, que habían sido previamente inoculados; clasificándose las plantas en sintomáticas y no sintomáticas, o sea, en sensibles y resistentes. Esta característica es usada como parámetro comparativo en todos los restantes ensayos, y las plantas son numeradas de manera que desde P1 hasta P13 corresponde a plantas no sintomáticas (resistentes) y desde p14 hasta P23 a plantas sintomáticas; de la misma manera, se toman controles inoculados sintomático y no inoculados asintomáticos.

Las evaluaciones para los diferentes parámetros se efectuaron durante un período de 6 meses durante los cuales los diferentes ensayos fueron repetidos durante diferentes lapsos a los que se denominó TIEMPO; estos fueron distribuidos de la siguiente manera, TIEMPO1: desde 6-2-2000 hasta 24-3-2.000 (52 días). TIEMPO 2: desde 25-3-2.000 hasta 17-4-2.000 (27 días), TIEMPO 3: desde 20-6-2000 hasta 20-7-2.000 (30 días); los ensayos de resistencia a Km abarcaron todo el lapso (TIEMPO), los ensayos de ELISA y la extracción de ADN se realizaron a aproximadamente la mitad de cada TIEMPO, la extracción de ADN se realizó solo para los lapsos (TIEMPO) 2 y 3. Luego de el TIEMPO 2 se realizó una reinoculación con el virus PRV, la cual fue evaluada después del TIEMPO 3.

1. Cultivo de plantas

Las plantas fueron cultivadas en condiciones de invernadero, en bolsas plásticas de 4 kg, usando como sustrato una mezcla 1:1 de tierra y arena. La fertilización se realizó cada dos meses, usando para cada planta, 0,2 g de fórmula 15:15:15 y 0,05 g de nitrato de calcio, de PALMAVEN; además de 0,15 ml de NITROFOSKA. EL riego se efectuó hasta

aproximadamente 1/2 de la capacidad de campo, en intervalos variables, dependiendo de la humedad atmosférica. La temperatura se mantuvo en un rango de 30-33°C y mínimas de 19-22°C. El fotoperíodo fue 13 horas de luz (la luz diurna más 1 hora de luz artificial) y 11 horas de oscuridad. Se controlaron infecciones fungosas usando fungicidas. No se registraron ataques de insectos durante el período de ensayos.

2. Infección de plantas con el virus PRSV

Se realizó la infección de plantas con el virus PRV, usando como inóculo, tejido vegetal tomado de plantas existentes en el invernadero, infectadas y sintomáticas. La infección se realizó de la siguiente manera: el material vegetal se maceró con en un mortero con un poco de buffer de inoculación (Anexo 2, 1) .

Las plantas fueron infectadas, cubriendo el ápice de una hoja con una pizca de carborundo; luego con un palillo de algodón estéril imbibido con el extracto vegetal, se rozo suavemente sobre el ápice de la hoja. Se asperjó con agua para eliminar el exceso carborundo.

Fueron reinoculados todos los tratamientos y controles inoculados existentes al momento, además de una planta de *Cucumis metuliferus* y una de lechosa no transgénica sin inoculación previa y mantenidas en las mismas condiciones del experimento.

3. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

Las hojas de lechosa fueron pulverizadas en un mortero previamente enfriado con N₂ líquido, cuidando de no dejar calentar.

Una porción de aproximadamente 400 mg de el macerado de hojas fueron colocados en un " eppendorff " estéril de 1,5 ml agregándole 400 µl de tampón de extracción (Anexo 2, 2.1) homogenizando luego con una punta estéril; después se agregaron 500 µl de una mezcla 25:24:1 de fenol pH 8, cloroformo y alcohol isoamílico, mezclando luego por inversión del tubo.

Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente en una microcentrifuga.

El sobrenadante fue colocado en un tubo nuevo, al cual se agregó 150 µl de acetato de amonio 10 M más 0.6 volúmenes de isopropanol, mezclándose todo por vortex, esta mezcla fue incubada 2 min a temperatura ambiente, para luego centrifugar en una microcentrifuga 15 min a 13.000 rpm, a temperatura ambiente.

El sobrenadante fue descartado, procediéndose a lavar el precipitado de ácidos nucleicos con etanol 70%, secando luego el tubo al vacío.

El precipitado, una vez lavado con etanol 70% y secado al vacío, fue resuspendido en 50 µl de buffer TE pH 8 (Anexo 2 , 2.3), suplementado con 200 µg/ ml de RNAasa A (Anexo 2, 2.2) colocando los tubos en un agitador orbital con agitación lenta, a 37°C por 3 días (cada día fue colocada una nueva dosis de RNAasa).

La RNAasa fue eliminada por medio de una nueva extracción con solventes, luego de lo cual se procedió a precipitar el ADN agregando 2 volúmenes de etanol y 0,1 volumen de acetato de sodio (pH 5,6), después se incubó 2 horas a - 20°C, luego de lo cual se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 rpm y seguidamente se descartó el sobrenadante y se lavó el "pellet" con etanol 70% . El "pellet" fue secado al vacío y luego resuspendido en 50 µl de TE pH 8, con agitación lenta, a 37°C, durante 3 días.

La concentración de ADN fue determinada espectrofotométricamente.

4. Extracción de ADN plasmídico

Se inoculó una colonia de la cepa portadora del plásmido de interés en 50 ml de medio de cultivo ML líquido (Anexo 1) suplementado con el o los antibióticos de selección (Tabla 5), específicamente Tc y Gn para pG482G y Ap para el pUC19, y luego se creció el cultivo hasta fase exponencial.

Una alícuota de 1,5 ml de cultivo fue colocada en un tubo “ eppendorff ” estéril en donde las bacterias fueron bajadas por centrifugación a 13.000 rpm por 15 seg, el “ pellet ” de bacterias fue resuspendiendo en 100µl de Solución I (Anexo 2, 3.1).

Se agregaron 200 µl de solución II (Anexo 2 , 3.2), mezclando a continuación por inversión del tubo, para luego incubar 5 min en hielo. Posteriormente fueron agregados

150 µl de Solución III (Anexo 2, 3.3), mezclando en el vortex con el tubo invertido; después se incubó en hielo por 5 min, para luego centrifugar a 12.000 rpm por 5 min.

Fueron transferidos 450 µl del sobrenadante a un tubo nuevo, agregándose 2 volúmenes de etanol absoluto e incubándose por 2 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugar 15 min, a 13.000 rpm en una microcentrífuga a temperatura ambiente.

Se descartó el sobrenadante, y luego se lavó el " pellet " con etanol 70%, secando a continuación el tubo por medio de vacío.

A continuación se resuspendió el " pellet " de ADN en 50 ml de TE suplementado con 200 g/ml de ARNasa.

El extracto bruto, así obtenido, fue purificado por medio de una extracción con fenol cloroformo 1:1, seguida de una extracción con cloroformo y finalmente una precipitación con etanol y resuspensión en buffer TE 50 µl de buffer TE.

5. Purificación de bandas de ADN a partir de geles de agarosa

Se usa una adaptación del método " Freeze squeeze ", publicado en (Molecular Genetic Lab).

Se cortó la banda de interés con un bisturí estéril y se colocó en un " eppendorff ", estéril de 1,5 ml. A continuación se agregó 1 volumen de agua destilada estéril y 2 volúmenes de fenol, equilibrado a pH 8.

El tubo, junto con su contenido fue congelado en N₂ líquido, y luego descongelado a 37°C, antes de llevarse a vortex fuerte por 1 min. Se repitió este paso 3 veces.

Se centrifugó durante 10 minutos, a 13.000 rpm, a temperatura ambiente.

Fue tomada la fase acuosa superior y se colocó en un tubo nuevo, cuidando de no remover los restos de agarosa.

Los restos de fase acuosa que permanecían en el tubo viejo fueron recuperados, agregando en este, 100 µl de buffer TE pH 8, luego se centrifugó a 13.000 rpm por 5 min y fue recuperada la fase acuosa la cual se unió a la obtenida anteriormente.

A la fase acuosa recuperada se le realizó una extracción con una mezcla 25:24:1 de fenol: cloroformo: isoamil alcohol, seguida de otra extracción con una mezcla 24:1

cloroformo: isoamil alcohol, recuperando cada vez los restos de fase acuosa con 100 µl de TE pH 8.

Para precipitar el ADN de la fase acuosa se agregaron 0,15 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5,6) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla fue congelada en nitrógeno líquido y luego enfriada hasta aproximadamente - 20°C, manteniéndose a esta temperatura por 30 min y luego se llevo a aproximadamente 4 °C, y se centrifugò a 13.000 rpm por 15 min en una microcentrífuga, se descartó el sobrenadante conservando el " pellet ", el cual fue lavado 2 veces con etanol 70% y finalmente resuspendido en 20 µl de agua con agitación manual suave, durante 30 minutos a 37°C.

6. " Polimerase chain reation "(PCR)

Las reacciones de amplificación se realizan con los primers:

JLS85:5'ATCATTCATGGCTGTGGATGCTGGTTTGA3'

JLS86:5'AGCTAACCATGGGGTGAAACAGGGTCGAGA3' esta pareja de " primers " fueron los usados por Fermín, (1.996) para clonar la secuencia *cp*, usada para transformar lechosa Las reacciones de PCR fueron preparadas de acuerdo al a la siguiente receta:

Buffer para PCR 10X	10%
MgCl ₂	Variable (1-1,25-1,5- 2,0).
dNTPs	200 µM (c/u)
Primers	2 ηg/µl
Taq	Variable (2-4-6-8 Unid. por cada 100 µl)
ADN	Variable(0,5-1-2-5-10 ηg/µl para genómico 2,5, 5, 10,100 pg/µl para ADN plasmídico)

Se ensayaron volúmenes de reacción de 50 µl bajo los siguientes temperaturas de amplificación:

94 °C	4,0 min	Hot Start
92 °C	2,0 min	desnaturalización
(variable) 40-45-50-55-60°C	1,0 min	anillamiento
72°C	2,0 min	Extensión
72°C	5,0 min	Extensión final
35 desde desnaturalización a extensión.		

Para la estandarización de las reacciones, se construyeron diferentes tratamientos, con los parámetros sometidos a variación. Estos parámetros corresponden a los parámetros con mayor influencia sobre la tasa de amplificación (temperatura de anillamiento, concentración de Taq-polimerasa, concentración de cloruro de magnesio), a estos parámetros se los denominó "variables ". Para cada parámetro " variable " se ensayaron cada uno de sus valores como se indica en la receta mientras eran mantenidas constantes las condiciones de los restantes parámetros " variables ". Estas condiciones constantes correspondieron a: Taq: 4 unidades por cada 100 µl; MgCl₂: 1,25 mM y concentración de ADN de 1 ηg/µl en el caso de las reacciones de genómico, y 5 pg/ µl en el caso de las reacciones de plasmídico. También se construyó una tabla cladística con los diferentes valores de los parámetros " variables " y se ensayaron algunos de los tratamientos así obtenidos.

Las muestras consistieron: a) mezcla de ADN proveniente de plantas resistentes a virus, b) mezcla de ADN de plantas sensibles a virus , c) ADN de plantas no transformadas (control negativo) d) Plásmido pUC19 cp+ (Control positivo), e) Plásmido pUC19 (control negativo). Además de mezclas de ADN, de tabaco, transformado con el mismo vector de transformación que se uso en lechosa y tabaco no transformado.

7. Obtención de sondas de ADN para *nptII* por síntesis *de novo*

Se preparó una sonda dirigida contra secuencias de *nptII*, está fue preparada por marcaje con dioxigenina por el método de " random primed ". El templado usado para esta reacción fue obtenido a partir de del vector de transformación pGA482G. Este plásmido

contiene dos sitios *Bam*HI de tal forma que la digestión *Bam*HI libera un fragmento de aproximadamente 2.767pb (An, 1.987). Este fragmento contiene la secuencia completa del gen *nptII*. La secuencia *nptII* llevada por pGA482G, corresponde a la versión del gen reportada por Mazodier et. al., (1.985), según es referido por Chee and Slightom, (1.992), esta secuencia fue clonada en el plásmido pGA482G, por la fusión en correcto marco de lectura de los primeros 14 codones del gen *nos* con el noveno codón de *nptII*, por medio de un " linker " *Bam*HI (Hall et. al., 1.993); de manera que uno de los sitios de corte del enzima *Bam*HI corresponde al sitio de clonaje de *nptII*. Esta versión de *nptII* presenta un sitio de corte para *Nco*I, sitio que es único en el gen y único en el plásmido (Mazodier et. al., 1.985; An, 1.987). De acuerdo a la ubicación del sitio *Nco*I, la digestión con esta enzima del fragmento 2.767 debería producir dos fragmentos : a) un fragmento " pequeño ", que en los geles de agarosa debería presentar un peso molecular cercano a los 600 pb, este fragmento

" pequeño" debería contener los primeros 564 pb (la mayor parte del gen *nptII* cuya longitud es de 784 pb); esta porción de *nptII* se ubica " aguas arriba " del sitio *Nco*I. b) un fragmento " grande " que contiene los restantes 220 pb de *nptII*, este fragmento en geles de agarosa debería presentar un peso molecular cercano a los 2. 200 pb.

Una vez confirmado el patrón de restricción de la doble digestión con *Nco*I y *Bam*HI en pGA482G, el fragmento de aproximadamente 600 pb, fue purificado a partir de los digeridos de doble digestión. Para la purificación se usó el método de purificación de bandas de ADN a partir de geles de agarosa descrito en este trabajo. El fragmento así purificado fue usado como templado para elaboración de sondas para *nptII*.

El marcaje se realiza con dioxigenina por medio de una reacción de " random primed " usando un " kit " de " Boehringer Mannheim " bajo el siguiente procedimiento:

Aproximadamente 0,3 µg de templado fueron resuspendidos en 10 µl de agua, luego se desnaturalizó el ADN por calentamiento en agua hirviente, por 10 min, inmediatamente después fue colocado en una mezcla hielo-etanol por 15 segundos. En frío se agregaron: 2 µl de la mezcla de hexanucleótidos (vial 5), 2 µl de la mezcla de dNTPs (vial 6) y 1 µl de Enzima de Klenow (vial 7).

Se mezcló y centrifugó brevemente y se incubó toda la noche a 37°C .

La reacción fue detenida, agregando 0,1 volúmenes de EDTA 0,2 M pH 8.

Luego se agregaron 2,2 µl de LiCl 4 M y 45 µl de etanol absoluto se incubó toda la noche

a - 20°C .

Se centrifugó a 13.000 rpm por 15 min, el sobrenadante fue descartado y el "pellet" recuperado fue lavado con etanol 70%, para luego secar ligeramente al vacío.

La resuspensión se hizo en 50 µl de TE pH 8, con agitación suave por 30 min a 37°C.

8. Hibridación

8.1 Por "dot blotting"(Para *cp* y *nptII*)

Procedimiento:

Se uso la técnica del "dot Blotting" para sondas marcadas con dioxigenina (en el caso secuencia *cp* se usó una sonda preparada por Briceño, (1.998) y en caso de *nptII* la preparada en este trabajo). Para el " dot " se siguió el procedimiento descrito en la " Genius User's Guide" de " Boehringer Mannheim ".

Se desnaturalizarón las muestras, agregando 0,1 volúmenes de una solución 4 M NaOH, 100 mM EDTA e incubando por 10 minutos a temperatura ambiente.

A una membrana de nylon cargada positivamente se agregó 1 µl de muestra, marcando con un lápiz su ubicación.

La membrana fue colocada sobre un papel " whatman " 3 MM, en una caja de Petri que se colocó, a 80°C durante 2 horas, para fijar el ADN.

Se procedió a la prehibridación, incubando la membrana durante 2 horas, a 65°C, en una caja de Petri contentiva de 15 ml de buffer de prehibridación (Anexo 2, 4.4). Seguidamente se descartó el buffer usado en la prehibridación y se agregaron 15ml de buffer de prehibridización, suplementado con la sonda (las concentraciones en cada caso fueron: aproximadamente, 10 ηg/ml para la sonda *nptII* y 20 ηg/ml , en el caso de la sonda *cp*) a continuación se incubó 12 horas a la temperatura de hibridación.

Luego de la hibridación se reveló la membrana en un proceso que comprendió los siguientes pasos:

Estabilización de la membrana en "genius buffer 1" (Anexo 2, 4.6) por 1 minuto

Bloqueo de la membrana en "genius buffer 2" (Anexo 2, 4.7) durante una o dos horas, a temperatura ambiente, al final de las cuales, se descarta el "genius buffer 2."

Se colocaron 12 ml de "genius buffer 2" suplementado con el anticuerpo antidioxigenina diluido 1: 10.000, incubando por 30 min. Se lavó luego la membrana 2 veces, con 100 ml de "genius buffer 1" por 15 min.

Se estabilizó la membrana, colocandola 1 minuto en "genius buffer 3" (Anexo 2, 4.8)

En una caja de Petri nueva, en la oscuridad, se colocaron 12 ml de buffer sustrato:(45 µl de NBT, 35 µl de X-fosfato en "genius buffer 3" (100 mM tris HCl, 100mM NaCl, 50 mM, MgCl, pH 9,5.) se incubó en completa oscuridad, por 16 horas.

La estandarización de esta prueba se realizó por medio de la variación de la temperatura de hibridación (usándose 60, 65 y 68 °C), y de la concentración de ADN, usándose alternativamente 25, 50, 100 ηg/µl.

Para esta prueba se usan como controles: a) el plásmido portador de la secuencia que se desea detectar (Control positivo), diluido 1/100, 1/200 y 1/500 respecto a la concentración de los tratamientos de ADN genómico, b) el mismo plásmido de (a) sin la secuencia a detectar o en su defecto un plásmido cualquiera (no portador de la secuencia de interés), igualmente diluido 1/100, 1/200 y 1/500, este constituye un (control negativo) c) El ADN genómico proveniente de plantas no transformadas, proporciona un control negativo sobre la muestra ensayada y detecta el grado de hibridación inespecífica en el genómico.

Para el caso de la hibridación *nptII*, además de los controles descritos se usa ADN de plantas de tabaco transgénico, comprobada su transgenicidad por ELISA para la proteína NPTII; de manera que el genómico de tabaco transformado constituye un control positivo y el de tabaco normal un control negativo.

8.2 Hibridación por "southern Blotting" (para *cp*)

Esta prueba se le realizó a ADN genómicos y a los plásmidos control digeridos con la enzima *HindIII*, usada para clonar el "cassette" de expresión que contiene a la secuencia *cp* a detectar.

Los digeridos fueron concentrados hasta una concentración de 1 µg/µl.

Las muestras de ADN fueron corridas con TBE 0,5 X, en geles de agarosa al 0,9% preparados en el mismo buffer de corrida al que además se agregó 0,1 µl/ml de solución de bromuro de etídio.

El " Souther " fue realizado por un procedimiento adaptado a partir de (Sambrot et. al., 1.989) y que comprende los siguientes pasos:

Desnaturalización del ADN, transfiriendo el gel a la solución desnaturalizante (Anexo 2, 4.1), por 30 min 2 veces.

Neutralización del gel incubando, durante 15 min en la solución neutralizante (Anexo 2, 4.2).

La transferencia del ADN, se realizó colocando el gel en posición invertida, sobre un trozo de papel " Whatman " 3MM, que había sido humedecido en solución SSC 10X

(Anexo 2, 4.3) y que estaba apoyado sobre un vidrio, de manera que los bordes quedasen introducidos en SSC 10X. Se colocó sobre el gel un trozo humedecido de membrana de nylon de mismo tamaño, de manera que no quedasen burbujas y a continuación sobre el nylon se colocó un trozo de papel Whatman del mismo tamaño y luego una pila de papel absorbente humedecido, encima de este otro vidrio y sobre este un peso. Se dejó toda la noche .

A continuación se procedió a fijar, hibridar y revelar la membrana, de la misma manera como se describió para el " dot blotting ".

9. Determinación de la concentración de Km a la cual aparecen síntomas (por aplicación directa en condiciones *in vivo*)

Para determinar la concentración de kanamicina a la cual aparecen síntomas, se aplicó sobre una de las hojas una gota de la solución de kanamicina, evaluando la aparición de síntomas al cuarto día de la aplicación. Se repitió la aplicación usando concentraciones cada vez mayores, hasta observar la aparición de síntomas de clorosis y necrosis en las hojas. Como control negativo se toma el comportamiento de plantas no transformadas.

10. Asignación de la sensibilidad a kanamicina

El grado de sensibilidad (inverso de la resistencia) a kanamicina es asignado de acuerdo a las concentraciones determinadas, clasificando como sensible a aquellas plantas que presentaron valores iguales o inferiores al control y como resistentes a aquellas con valores superiores al control.

11. Determinación de la proteína NPTII por ELISA

Estos ensayos se realizan usando el "Kit" de detección para NPTII de INC. Boulder Co. bajo el siguiente procedimiento:

Se prepararon extractos de hojas, triturando 100 mg de hojas en 1ml de buffer de extracción.(Anexo2, 6.1)

Se cubrió la cámara con los anticuerpos antiNPTII diluidos 1:1.000 en buffer de recubrimiento, se incubó 2h a 37°C. Se lavó 3 veces con buffer de lavado (PBS 0,5% de Tween 20).

Se agregó el buffer de bloqueó, incubandose 2h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavo 3 veces con buffer de lavado.

A continuación, fueron colocadas las muestras, agregando 50 µl del extracto y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche, a 4°C. Después se lavó, 3 veces con buffer de lavado.

Se agregaron 50 µl los anticuerpos antiNPTII biotinilado diluidos 1: 1.500 en buffer de conjugación (PBS 1 X, 2% PVP, 0,1% BSA) se incuba 1 hora a 27°C y luego se lavó 3 veces con buffer de lavado.

Se agregaron 50 µl streptavidina conjugada a la fosfatasa alcalina diluída 1: 2.500 en buffer de conjugación (Anexo2, 6.4). Se lavó 3 veces

Se agregaron 50µl de sustrato preparado disolviendo una pastilla (5mg) de p-nitrofenil fosfato (SIGMA) en 12 ml de buffer para sustrato(97ml /l de dietanolamina 0,2g/l NaN₃ pH 9.9)

La reacción fue validada midiendo la OD a 405 nm o se validó visualmente a un tiempo de 5, 10, y 15 min. Cuando el ensayo es realizado por validación visual todas las

muestras son llevadas a la misma concentración de proteína total determinada por el método Bradford. Cuando se realizó por medición espectrofotométrica, los valores de cada muestra, medidos por el elisometro fueron corregidos dividiendo la OD del ELISA entre la OD de Bradford.

Como controles se toman plantas de lechosa no transformadas (control negativo) y como referencia comparativa se usan las mediciones realizadas simultaneamente en descendientes de tabaco transgénico .

Se realizó un ensayo de estandarización usando el esquema cladístico, variando las concentraciones de los anticuerpos para el anticuerpo biotinilado se probaron concentraciones de : 1/500, 1/1.000, 1/2.000 y para el no biotinilado concentraciones de: 1/1.000 , 1/1.500; 1/2.500 y asimismo se ensayaron concentraciones de muestra de: 1, ½, 1/10.

RESULTADOS

1.- Sensibilidad a virus

Previo a los ensayos de este trabajo las plantas descendientes de lechosa transgénicas estaban inoculadas con el virus PRSV, observándose que algunos de los descendientes habían desarrollado síntomas persistentes de deformación de las hojas, clorosis, reducción del grosor de la lámina foliar y algunas necrosis en el borde las hojas; síntomas que acompañan a la infección de PRSV. En algunos descendientes, así como en los controles no inoculados estos síntomas no se observaron. De manera que se clasificó como sensibles a las plantas descendientes sintomáticas y resistentes a las no sintomáticas.

Después de la reinoculación de estas plantas con el virus PRSV, no se observó reversión del fenotipo resistente en ninguna de las plantas que originalmente eran resistentes y que fueron de nuevo inoculadas. En cuanto a los controles para la infección. La planta de *C.metuliferus* usada como control para la infectividad de los inoculos de PRV, no pudo ser evaluada por cuanto murió a causa de un ataque fúngico. En la planta de lechosa no transgénica se observaron algunos síntomas luego de aproximadamente 70 días.

2. “ Dot blotting ” para la detección de *cp*

En las pruebas de "dot blotting" los resultados óptimos (en donde se observó la reducción de las hibridaciones inespecíficas a la par de la acentuación de la diferencia entre las muestras), fueron obtenidos cuando la concentración de ADN fue de 100 $\eta\text{g} / \mu\text{l}$ y la temperatura de hibridación fue de 65°C, con una concentración de sonda de aproximadamente 20 $\eta\text{g/ml}$. Bajo estas condiciones óptimas, se realizo un ensayo con todas las muestras y controles experimentales, el resultado de este ensayo se muestra en la Figura 1. Aquí se pudo comprobar la reproducibilidad de las observaciones realizadas en los ensayos preliminares y pueden observarse las características de los controles y tratamientos.

En este ensayo se observaron diferencias apreciables entre el control plasmídico positivo, plásmido pUC19cp+ (FIG.1, numero 2), con respecto al control plasmídico negativo, pUC19 sin inserto (Fig.1, número 5, 8). Las muestras provenientes de plantas no sintomática

(resistentes) al virus PRV; Fig.1. Muestras P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10 ,P11, P12, P13, presentaron un mayor grado de hibridación comparado con los controles negativos pUC19 sin inserto y lechosa no transformada (Fig.1, números 6, 7). Asimismo, las muestras provenientes de plantas sensibles al virus, (Fig.1, muestras P14, P15, P16, P17, P19, P20, P21, P22, P23), mostraron un menor índice de hibridación que las muestras provenientes de plantas resistentes al virus y de los controles positivos. Las muestras de la planta P18, que fue sensible al virus y sin embargo, mostró hibridaciones similares a las muestras de controles positivos y a las plantas resistentes, constituyo una excepción en el comportamiento general observado.

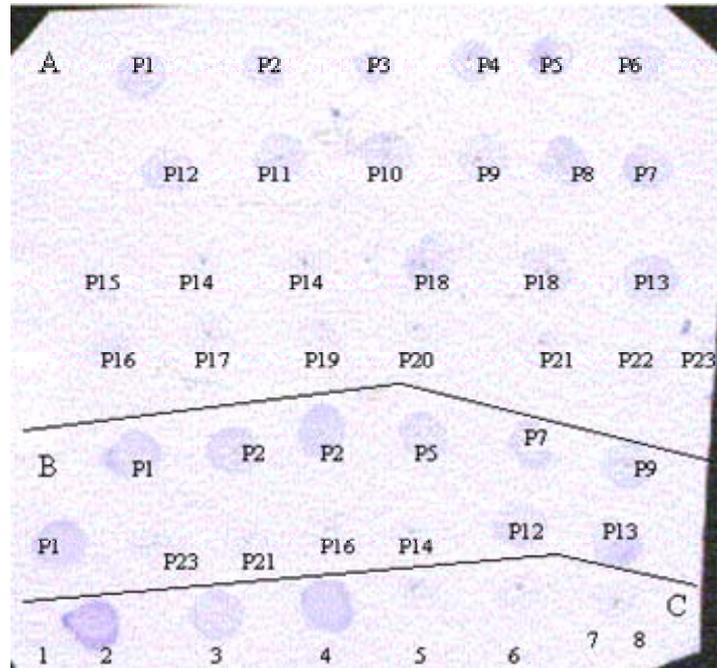


Figura. 1. Membrana de hibridación de " dot blotting " para la detección del gen *cp* en descendientes de lechosa y controles respectivos

A,B, C son sectores en la membrana de forma que en A se encuentran las muestras de ADN tomadas TIEMPO 1, en B las muestras de ADN del Tiempo 3 y en C los controles. Las diferentes muestras de descendientes, son indentificadas con el número de la planta. y las muestras de los controles con una numeración como se indica a continuación:

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1 = pUC19 1/200 | 5 = Plasmido pUC19 1/100 |
| 2 = Plásmido pUC19cp+ 1/100. | 6 = Planta control inoculada |
| 3 y 4 = Plásmido pUC19cp+ 1/200 | 7 = Planta control no inoculada |
| | 8 = pUC19 1/200 |

3. " Southern blotting " para la detección del gen *cp*

Este ensayo se realizó con muestras digeridas con *Hind*III (enzima usada para clonar el "cassete" de expresión que contiene al gen *cp*); se esperaba la liberación de un fragmento de alrededor de 2.000 pb correspondiente al "cassete" de expresión en donde se encuentra inserta la secuencia *cp*. Este fragmento, aparentemente fue liberado del plásmido pUC19cp+ (plasmido en donde se encuentra clonado el cassete de expresión y que sirve de control positivo). En la membrana hibridada con la sonda para *cp*, se observó lo siguiente:

en la muestra de pUC19 *cp*+ (Fig 2, canal 2) se observa la hibridación de una banda de aproximadamente el tamaño esperado; esta banda esta ausente en la muestra de pUC19 sin inserto (Fig 2, canal 1), esta misma banda es claramente visible para una de las muestras de ADN de plantas de lechosa virus resistentes que, además, fueron positivas para "dot" *cp* (Fig 2, canal 5); estando ausente para las muestras de plantas "dot" negativas que son sensibles al virus (Fig 2, canales 4 y 6).

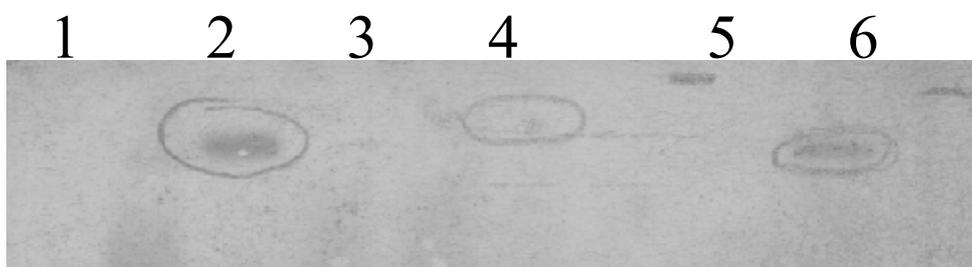


FIG . 2. Souther para la detección de secuencias *cp* en descendientes transgénicos

Electroforesis realizada en un gel de agarosa a 0,9% más 0,1μl/ml de bromuro de etidio, preparado y corrido en TBE.

1= pUC19 sin inserto; 2=pUC19*cp*+; 3 y 5= ADN de plantas sensible a virus, dot-; 4y 6=ADN de plantas resistente, dot+

4. Resultados de PCR para la detección del gen *cp* en descendientes transgénicos de lechosa

Los diferentes ensayos de PCR no mostraron amplificación específica en ninguno de los tratamientos ensayados. En estas reacciones se observó la ausencia de amplificación para temperaturas de anillamiento superiores a 56 °C y concentraciones de cloruro magnesio inferiores a 1,25 mM, de manera que en la construcción sistema cladístico de tratatamientos, se hizo mayor énfasis en condiciones de amplificación menos estrictas. Bajo estas condiciones solo se observó la producción de amplificados inespecíficos, cuyas bandas se encontraron presentes tanto en los controles positivos como en los negativos y presentes en todas las muestras de plantas.

5. Determinación de la concentración de kanamicina a la cual aparecen síntoma

Con respecto a este ensayo de concentración de Km a la cual aparecen síntomas, no fue posible observar diferencias entre los descendientes transgénicos y los controles no

transformados, ni tampoco en los diferentes descendientes entre si. El hecho de estar las plantas inoculadas con virus previamente a estos ensayos, supuso la introducción de una variable influyente sobre estos experimentos; hecho que dificultó la interpretación de los resultados. Estos son analizados y comentados con mayor amplitud en la discusión del trabajo.

Tabla 6. Determinación de la concentración de Km (g/ml) a la cual aparecen síntomas por aplicación directa en condiciones *in vivo*. Fenotipo asignado de resistencia a Km

Planta	TIEMPO 1	TIEMPO 2	TIEMPO 3	RANGO	Fenotipo asignado S/R
PC No inoculado	70	65	60	60-70	
PC No inoculado	70	65	65	65-70	
PC No inoculado	65	70	70	65-70	
PC inoculado	50	50	45	45-50	
PC inoculado	40	nr	nr	nr	
PC inoculado	50	45	50	45-50	
P1 (VR)	70	65	65	65-70	S
P2 (VR)	65	65	65	65	S
P3 (VR)	60	nr	nr	nr	S
P4 (VR)	65	65	nr	65	S
P5 (VR)	65	65	65	65	S
P6 (VR)	65	70	nr	65-70	S
P7 (VR)	65	65	70	65-70	S
P8 (VR)	65	nr	nr	nr	S
P9 (VR)	65	70	65	65-70	S
P10 (VR)	60	nr	nr	nr	S
P11 (VR)	70	65	65	65-70	S
P12 (VR)	65	nr	nr	nr	S
P13 (VR)	60	65	65	60-65	S
P14 (VS)	50	45	45	45-50	S
P15 (VS)	45	nr	nr	nr	S
P16 (VS)	50	50	50	50	S
P17 (VS)	50	45	nr	45-50	S
P18 (VS)	50	nr	nr	nr	S
P19 (VS)	45	45	45	45	S
P20 (VS)	50	50	nr	50	S
P21 (VS)	45	50	50	45-50	S
P22 (VS)	45	50	nr	45-50	S
P23 (VS)	45	50	50	45-50	S

R=resistente, S= Sensible, PC= Planta control, VS= Virus sensible, VR= Virus resistente nr=observación no registrada, TIEMPO 1 : 6-2-2000 hasta 24-3-2.000(52 días). TIEMPO 2: 25-3-2.000hasta 17-4-2.000(27 días) , TIEMPO 3 : 20-6-2000 hasta 20-7-2.000(30 días).

6. Ensayos de ELISA para determinación de NPTII

La Tabla 7, muestra los resultados de los ensayos de ELISA para la detección de NPTII de las diferentes plantas, a los diferentes TIEMPOS. Para los tres tiempos ensayos, se observó un patrón común caracterizado por la igualdad de respuesta en todas las plantas. La intensidad de la coloración amarilla observada fue la misma para todas las muestras de plantas descendientes y los controles negativos (plantas no transgénicas); es decir, no fue posible observar diferencias entre plantas descendientes o entre estas y los controles no transformados. Este mismo comportamiento fue observado cuando la validación se realizó espectrofotométricamente, resultados presentados en la tabla 8, (2); (valores para lechosa). La variación de las condiciones experimentales (concentración de anticuerpos y muestra, como se describe en los procedimientos), no produjo cambios apreciables en los resultados; de igual forma, con adición PMSF a las muestras (valores correspondientes al TIEMPO 3, Tabla 7), aquí tampoco pudieron observarse diferencias significativas entre las diferentes muestras, aunque si se produjo un ligero aumento en la coloración amarilla, explicable por la inhibición de proteasas que actuarían sobre los componentes proteínicos del Kit de ELISA.

Tabla7. Resultados de ELISA para la determinación de la proteína NPTII en descendientes de *Carica papaya*.L transgénicas

PLANTA	TIEMPO 1	TIEMPO 2	TIEMPO 3
PC No inoculado	+++	+++	++++
PC No inoculado	+++	+++	++++
PC No inoculado	+++	+++	++++
PC inoculado	+++	+++	++++
PC inoculado	+++	nr	nr
PC inoculado	+++	+++	++++
P1 (VR)	+++	++++	++++
P2 (VR)	+++	+++	++++
P3 (VR)	+++	nr	nr
P4 (VR)	+++	+++	nr
P5 (VR)	+++	+++	++++
P6 (VR)	+++	+++	nr
P7 (VR)	+++	+++	++++
P8 (VR)	+++	nr	nr
P9 (VR)	+++	+++	++++
P10 (VR)	+++	nr	nr
P11 (VR)	+++	+++	++++
P12 (VR)	+++	nr	nr
P13 (VR)	+++	+++	++++
P14 (VS)	++++	+++	++++
P15 (VS)	+++	nr	nr
P16 (VS)	+++	+++	++++
P17 (VS)	+++	+++	nr
P18 (VS)	+++	nr	nr
P19 (VS)	+++	+++	++++
P20 (VS)	+++	+++	nr
P21 (VS)	+++	+++	++++
P22 (VS)	+++	+++	nr
P23 (VS)	+++	+++	++++

nr= Observación no registrada, PC= Planta control no transgenica, VR= Virus resistente, VS= Virus sensible, +=representa graduaciones de la coloración amarilla producida por el pnitrofenilfosfato usado para revelar las placas.

TIEMPO 1 : 6-2-2000 hasta 24-3-2.000(52 días). TIEMPO 2: 25-3-2.000hasta 17-4-2.000(27 días) , TIEMPO 3 : 20-6-2000 hasta 20-7-2.000(30 días).

En la Tabla 8 se compara el sistema de descendientes transgénicos de lechosa con el de descendientes transgénicos de tabaco portadores del mismo gen, observándose que mientras en tabaco las plantas que muestran menor sensibilidad (mayor resistencia) a la Km,

muestran índices de ELISA-NPTII que superan en un porcentaje cercano al 200% a aquellos de mayor sensibilidad (menor resistencia) al antibiótico. En lechosa no pueden apreciarse mayores diferencias entre las distintas muestras.

Tabla 8. Cuadro comparativo de los resultados de la actividad del marcador *nptII* en descendientes de lechosa transgénica comparados con descendientes de tabaco transgénico.

PLANTA	(1) Concentración de Km (g/l) a la cual aparecen síntomas	(2) Índice de ELISA-NPTII (ODELISA/ODBradford)
tabaco PC	4	0,22
tabaco PC	4	0,28
tabaco P1	12	0,60
tabaco P2	12	0,58
tabaco P3	14	0,52
tabaco P4	12	0,58
tabaco P5	4	0,20
tabaco P6	4	0,26
tabaco P7	4	0,21
Lechosa PC no inoculado	70	0,39
Lechosa PC inoculado	40	0,37
Lechosa P3 (VR)	70	0,35
Lechosa P8 (VR)	65	0,39
Lechosa P10 (VR)	65	0,35
Lechosa P15 (VS)	50	0,32
Lechosa P18 (VS)	45	0,35

P=Planta descendiente VR= Virus resistente

PC=Planta control

VS=Virus sensible

7. Obtención de sondas para *nptII*

Se comprobó el patrón de restricción del plásmido pGA482G del cual se obtuvo el templado usado para producir sondas para *nptII* por marcaje con dioxigenina mediante "random primer". En este particular la digestión del plásmido con *Bam*HI liberó el fragmento esperado de aproximadamente 2.667Kb (Fig. 3, canal 1). Este fragmento fue purificado a partir del gel de agarosa y digerido con *Nco* I, produciéndose las dos bandas esperadas una pequeña de aproximadamente 600 pb (contentiva de los primeros 564 pb de *nptII*) y otra grande de aproximadamente 2.200 pb (Fig. 3, canal 2). En la corrida de la doble digestion de pGA482G con *Bam*HI y *Nco*I, se observan dos bandas idénticas a las obtenidas mediante la digestión con *Nco*I del fragmento de 2.667 pb (Fig.3, canal 3).

Las sondas producidas a partir de este fragmento de 600 pb resultaron ser específicas para el gen *nptII*, como se comprobó por el grado superior de hibridación de esta sonda observado en tabaco transgénico con respecto a tabaco no transformado Fig.4. Sector B, muestras número 6, 7 comparados con 4, 5).

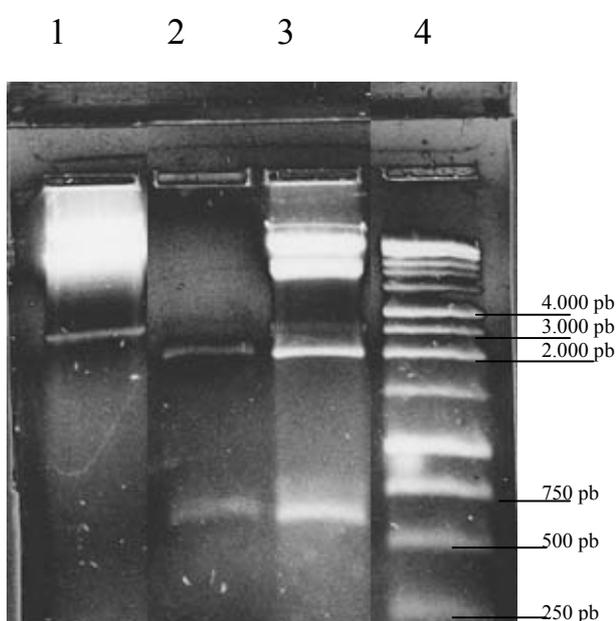


Figura3. Patrón de restricción del plásmido pGA482G al ser digerido con las enzimas *Nco*I y *Bam*HI.

1= Plásmido pG482G digerido con *Bam*

2= Fragmento de 2.767 pb purificado y digerido con *Nco*I

3= Plásmido pG482G digerido con *Bam* HI y *Nco*I

4= Marcador de peso molecular (1 kb ladder)

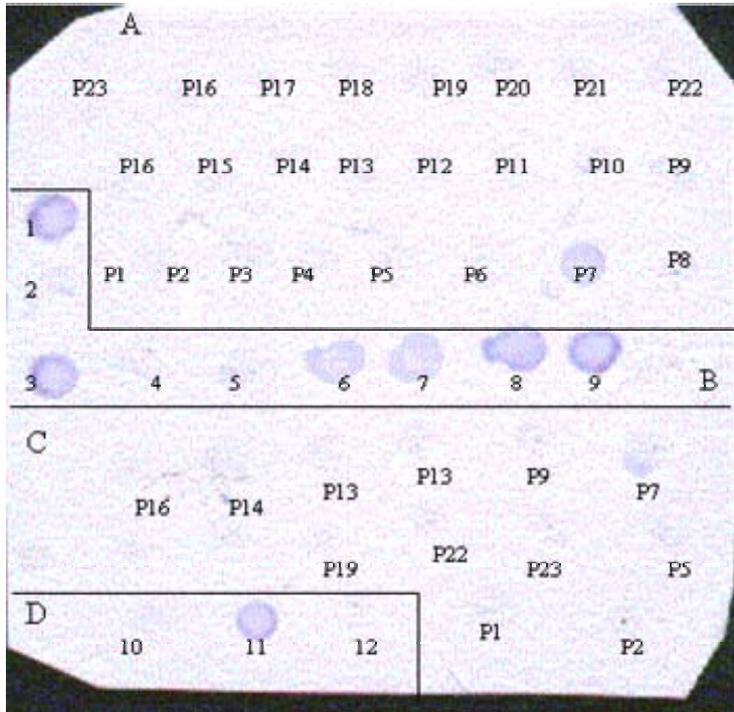
8. Hibridación “ dot blotting “para *nptII*

Para este ensayo los mejores resultados se obtienen con concentraciones de ADN 50 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$, a la temperatura de hibridación de 65°C; cuando la concentración de la sonda es de aproximadamente 10 $\eta\text{g}/\text{ml}$. La Figura 5 representa una hibridización de todas las muestras, realizada bajo las condiciones óptimas mencionadas, obteniéndose los resultados siguientes:

El control plasmídico positivo pG482G (Fig. 4. números 1, 3, 8, 9), mostraron un mayor grado de hibridación que el control plasmídico negativo pUC19 (Fig.4. número 2). En los controles para la hibridación específica en plantas también se observó una diferencia apreciable entre los controles positivos tabaco transgénico para *nptII* (Fig.4, números 6, 7) con respecto a tabaco no transformado (Fig.4, números 4, 5).

En los tratamientos los resultados pueden resumirse de la siguiente manera: a excepción de las muestras provenientes de la planta P7, ninguna de las muestras de descendientes ensayadas mostró grados de hibridación comparables a los controles positivo, o superiores a los controles negativos. Estos resultados pueden visualizarse en la Figura 4.

Figura 4. Membrana de hibridación para la detección por "dot blotting" del gen nptII en descendientes de lechosa.



Las muestras provenientes de los descendientes son identificadas con el número de la planta.

Los controles son numerados de la manera siguiente:

1=pGA482G 1/100

2=pUC19 1/100

3=pGA482G 1/100

4,5= tabaco no transformado

6,7= tabaco transgenico

8,9=pGA482 1/100

10,12= lechosa no transformada

11=pG482G 1/200.

A,B,C,D son sectores en la membrana que corresponden a:

A=Muestras de ADN al TIEMPO 1

B=Controles

C=Muestras de ADN al TIEMPO 3

D=Controles.

En la Tabla 9 se presenta una compilación de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de detección para las diferentes plantas, durante los tres TIEMPOS evaluados. Para las pruebas de ELISA y sensibilidad a Km se presenta la clasificación asignada a cada planta de acuerdo a su comportamiento en base al conjunto de ensayos correspondientes a los tres tiempos. Para aquellas plantas en donde no existen observaciones para alguno de los tiempo (nr), se asigna la clasificación en base al comportamiento en las observaciones que pudieron registrarse (se asignan la clasificación aun con una sola observación). Los detalles del comportamiento de las diferentes plantas con respecto a Sensibilidad a Km y ELISA son presentados en las tablas 6 y 7 respectivamente.

Tabla 9

Cuadro comparativo de los resultados de los diferentes ensayos en
desendientes de *Carica papaya*. L.

Planta	Sensibilidad a Virus		Hibridación Dot-ep		Resistencia a km	ELISA- NPTII	Hibridación Dot-nptII	
	TIEM1	TIEM3	TIEM1	TIEM3			TIEM1	TIEM3
PC No inoculado	Asint	Asint	-	-	-	-	-	-
PC No inoculado	Asint	Asint	-	-	-	-	-	-
PC No inoculado	Asint	Asint	-	-	-	-	-	-
PC Inoculado	sint	sint	-	-	-	-	-	-
PC Inoculado	sint	nr	-	nr	-	-	-	nr
PC Inoculado	sint	sint	-	-	-	-	-	-
P1	Asint	Asint	+	+	-	-	-	-
P2	Asint	Asint	+	+	-	-	-	-
P3	Asint	nr	+	nr	-	-	-	nr
P4	Asint	nr	+	nr	-	-	-	nr
P5	Asint	Asint	+	+	-	-	-	-
P6	Asint	nr	+	nr	-	-	-	nr
P7	Asint	Asint	+	+	-	-	+	+
P8	Asint	nr	+	nr	-	-	-	nr
P9	Asin	Asint	+	+	-	-	-	-
P10	Asint	nr	+	nr	-	-	-	nr
P11	Asint	Asint	+	nr	-	-	-	nr
p12	Asint	nr	+	+	-	-	-	-
p13	Asint	Asint	+	+	-	-	-	-
p14	sint	sint	-	-	-	-	-	-
p15	sint	nr	-	nr	-	-	-	nr
p16	sint	sint	-	-	-	-	-	-
p17	sint	nr	-	nr	-	-	-	nr
p18	sint	nr	+	nr	-	-	-	nr
p19	sint	sint	-	-	-	-	-	-
p20	sint	nr	-	nr	-	-	-	nr
p21	sint	sint	-	-	-	-	-	-
P22	sint	nr	-	nr	-	-	-	nr
P23	sint	sint	-	-	-	-	-	-

Asin= Asintomático

PC= Planta Control

nr= No registrado

+ =Resultado Positivo

- =Resultado Negativo

Tiem=TIEMPO TIEMPO 1 : 6-2-2000 hasta 24-3-2.000 (52 días). TIEMPO 2: 25-3-2.000hasta 17-4-2.000 (27 días), TIEMPO 3 :
20-6-2000 hasta 20-7-2.000(30 días)

DISCUSIÓN

La comparación de los resultados observados en la inoculación con virus con los resultados de los ensayos de hibridación por "dot blotting", señala la existencia de una fuerte correlación entre la detección de la secuencia del gen *cp* por esta técnica con la resistencia observada en las plantas a la infección por PRSV. Este resultado permite, asociar la resistencia a virus observada en estas líneas con la detección de la secuencia del transgen determinante de resistencia a virus. De la misma manera, se confirma la transgenicidad de aquellos descendientes que manifiestan resistencia al virus, que habrían recibido copias funcionales del gen *cp*, por medio de la segregación a partir de los progenitores transgénicos también resistentes. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros casos de transformación de lechosa con genes de la capsidie proveniente de PRSV, en los cuales es posible observar resistencia completa a cepas homólogas o geográficamente cercanas

(Futchs et.al, 1.997; Tennant et.al, 1.994), específicamente para las transformaciones con la secuencia de *cp* del virus PRSV cepa HA-5-1 de Hawai, en donde se reportó la obtención de plantas transgénicas resistentes al HA-5-1 y cepas de regiones cercanas al punto de origen de dicha cepa (cepas de Hawai). Asimismo, en los descendientes de plantas transgénicas se ha observado la segregación de la resistencia al virus (Fuchs et. al, 1.997).

Con respecto a la excepción representada por la planta P18 que fue Dot + y que sin embargo, fue sintomática al virus, esta excepción representa el 7,14 % del total de los descendientes portadores del gen *cp*. Es de observar que las transformaciones con los genes de la capsidie de virus, aun en los casos en donde se obtienen altos grados de resistencia es común, que una parte de las transgénicas obtenidas no manifieste la resistencia al virus. Este porcentaje es variable y es por lo general es bajo entre 2-5%, pero puede alcanzar grandes proporciones 30-45%, según se puede concluir de los datos para diferentes transformaciones y especies suministrados por Fuchs et. al, (1.997). Este comportamiento podría corresponder a algún tipo de silenciamiento génico o a una dosis génica insuficiente para generar resistencia al virus. En lechosa transformada con el gen de la capsidie del virus PRSV, se ha reportado la aparición de algunas reversiones de fenotipo resistente a sensible, en condiciones de campo y luego de un período de 20 meses de

cultivo (Fuchs et. al, 1.997). A este tipo de reversiones podría corresponder el comportamiento observado en la planta P18. Los resultados de detección de *cp*, para los tiempos inicial y final del periodo evaluado, en donde todas las plantas que fueron "dot" positivas al TIEMPO 1, lo fueron también al TIEMPO 3, permiten concluir que las secuencias de *cp* recibidas por los descendientes, se mantuvieron integradas al genoma de las plantas. Y de acuerdo a los resultados de infección de plantas con PRSV, en donde todas las plantas que inicialmente fueron resistentes mantuvieron esta característica luego de la reinfección con el virus, se concluye la expresión del gen *cp* se mantuvo estable durante el periodo evaluado; no observándose tendencia al silenciamiento, en las condiciones ambientales a las que fueron sometidas las plantas durante el periodo de experimentos, la inactivación de *cp* en P18, habría ocurrido durante el período anterior a la realización de los ensayos entre los 0 y 8 meses de edad de esta planta. En la incidencia del silenciamiento influyen fuertemente además de la tendencia genética, los factores ambientales (Dale et. al 1.998; Meins, 2.000); esto podría explicar las diferencias en cuanto a la edad de las plantas a la cual se manifiesta este fenómeno en ambos casos (el experimento citado en Fuchs et. al. (1.997) y el realizado en este trabajo). Respecto al tipo de silenciamiento que estaría actuando para el gen *cp*, en este caso, debido a falta de evidencia experimental (determinación de ARN nuclear y citoplasmático de *cp*), no es posible distinguir con completa certeza entre PTGS y TGS; sin embargo, considerando que la actividad de los genes determinantes de resistencia a virus (*cp*), puede ir asociada a un tipo de silenciamiento similar al PTGS, por medio de la producción de alguna forma de ARN aberrante a partir del gen *cp*, estos ARN aberrantes, inducirían los factores responsables del silenciamiento, provocando su supresión, conjuntamente con los ARN del virus infectante (Voinnet et. al, 1.999; Matzke et. al, 2.000). En base a estas consideraciones puede predecirse que el tipo de silenciamiento incidente en el caso observado en la planta P18, sería una forma de TGS, que impide la producción de ARN a partir de *cp* en esta planta.

Aunque en muchos casos una porción de las transgénicas puede no expresar eficientemente el marcador de resistencia; en general, no se tienen reportes de que el silenciamiento (pérdida de la actividad de resistencia al virus) o la pérdida del marcador *cp*, represente un problema limitativo en el aprovechamiento de estas plantas transgénicas.

Podría decirse que en estos genes se observa cierta tendencia a ser estables, hecho que sería explicable por un modo de acción que involucra la cosupresión por silenciamiento; de manera que el silenciamiento, que en el caso de otros transgenes constituye el principal factor de inestabilidad en el caso de los genes *cp* contribuye a su mecanismo de acción.

Los resultados de pruebas de hibridación para *cp* cuyos resultados fueron corroborados por "Souther", sugieren que la técnica de hibridación dot, sería un método confiable para la detección de las secuencias del gen *cp*; así como la predicción del fenotipo de resistencia en las condiciones del experimento. Los diferentes reportes disponibles, sobre el uso de técnicas de hibridación para la detección de *cp* de PRSV contienen resultados satisfactorios mediante la aplicación de estas técnicas (Tennant et. al, 1.994; Briceño, 1.998; Cheng and Yeh, 2.000). Al contrario del "dot" la técnica de PCR en su forma elemental y con los primers ensayados arrojó resultados negativos. Referencias al respecto indican que esta técnica (PCR) puede ser muy útil en la detección de secuencias *cp*, tanto en virus como en los genes clonados en el genoma de plantas (Roberson et. al 1.991; Rubino et. al, 1.993; Wetzal et.al, 1.991). Sin embargo, los reportes con respecto, a la amplificación en la secuencia *cp*-PRSV con los primers JLS-85 y JLS-86, son contradictorias, en algunos casos los resultados son positivos, tanto para amplificaciones a partir del genoma viral (cDNA) como a partir del genoma de plantas transgénicas (Fermín, 1.996; Fermín, Comunicación personal) y en otros experimentos, bajo condiciones similares, no es posible observar amplificaciones (Briceño, 1.998), en otros casos puede observarse amplificación para algunas muestras de transgénicas pero no para otras (Dagert, 1.999). De manera que debe existir algún factor no determinado que, en algunas situaciones inhibe las reacciones de amplificación.

Como criterio para establecer la sensibilidad a Km, se usó la concentración de Km necesaria para observar síntomas, por aplicación directa en condiciones *in vivo*, esta técnica ha resultado ser efectiva en la determinación de transgenicidad en plantulas de tomate y tabaco(Weide et al. 1.989) (observaciones personales, no publicadas). Sin embargo, en la situación del presente trabajo la realización de esta prueba simultaneamente con el establecimiento de la infección viral, aparentemente supuso la introducción de una variable influyente sobre estos experimentos. Como puede apreciarse en la tabla 6, existe un diferente grado de sensibilidad a kanamicina de las plantas control

inoculadas con respecto a las plantas control no inoculadas, se observa que existe una mayor sensibilidad al antibiótico, en las plantas control inoculadas con respecto a las plantas control no inoculadas; esta divergencia en el comportamiento con respecto a los efectos del antibiótico, de las plantas control no transgénicas dependiendo de si estas fueron o no previamente inoculadas, fue atribuida al efecto adicional que representa el desarrollo de la infección viral sobre el tejido infectado. Debido a que tanto la infección viral como la acción del antibiótico se traducen en un efecto deletéreo sobre el tejido vegetal, en las plantas donde tiene en curso la infección, el efecto destructivo de esta, se sumaría al representado por el antibiótico, traduciéndose en una aparente mayor sensibilidad a antibiótico.

Para las evaluaciones en los descendientes transgénicos, el problema anterior fue abordado dividiendo la población de plantas en dos grupos: el grupo A representado por aquellos descendientes en donde se evidenció el desarrollo de síntomas del virus (sensibles al virus), en este grupo se uso como control comparativo para la resistencia a antibiótico, plantas control no transgénicas inoculadas con virus, estas presentaban los síntomas deletéreos propios del virus. El grupo B, de plantas descendientes no sintomáticas para la inoculación, que fue contrastado respecto a resistencia a antibiótico con plantas control no inoculadas (plantas completamente sanas). De esta manera, la variable influyente representada por el desarrollo de la infección viral en las plantas sintomáticas, queda incluida dentro de los controles. Para los diferentes ensayos de sensibilidad a kanamicina (Tabla 6) no se observó diferencia en la respuesta de las plantas descendientes, al comparalos con sus respectivos controles. En la tabla 6 se presenta la comparación los rangos de concentración de Km necesarios para producir síntomas en las diferentes plantas. Para el grupo A (plantas desde P14 hasta P23 que se comparan con los controles inoculados), se observa que en los controles inoculados la concentración de Km requerida para producir síntomas esta comprendida en un rango de 40 - 50 g/ml y las plantas sintomáticas presentan rangos comprendidos igualmente entre 40-50 g/ml. En el grupo B, que incluye a las plantas comprendidas desde P1 hasta P13 (no sintomáticas al virus), que se comparan con los controles no inoculado, en este grupo se observan rangos comprendidos entre 60-70g/ml tanto para los controles como para los tratamientos. Estos resultados indican que no existe diferencia relevante en la sensibilidad a antibiótico, entre

las plantas descendientes y los respectivos controles de su grupo. Lo cual es mas notorio cuando se comparan con las diferencias control-tratamiento de tabaco transgénico tabla 8 en donde la diferencia de las plantas resistentes respecto a los controles es superior al 200%. En conclusión en los descendientes de lechosa transgénica no se apreció resistencia a kanamicina. No se disponen de referencias acerca de la realización de pruebas de sensibilidad a Km *in vitro* o *in vivo*, en plantulas o explantes sometidos a la acción del virus.

Los resultados de la prueba de sensibilidad al antibiótico son congruentes con los de ELISA para NPTII en donde no fue posible apreciar diferencias entre el comportamiento del grupo de descendientes entre si o de estos con respecto a los controles no transgénicos (Tabla 7). Este conjunto de resultados conducen a la idea de que en las plantas evaluadas no existía la codificación de la proteína NPTII y por lo tanto no se manifiesta resistencia a kanamicina; hecho que se atribuyó a que la en población de descendientes transgénicos que constituyen la muestra estudiada, el gen *nptII* se encontraría perdido o en un estado silente. Se realizaron ensayos de detección del gen *nptII* para tratar de discernir entre estas dos posibilidades. Los resultados de hibridación "dot" para *nptII* Fig 4, son congruentes con la idea de perdida del marcador *nptII*. Al comparar el índice de hibridación de las muestras de descendientes entre ellas no se observa ninguna diferencia a excepción de la muestra proveniente de la planta P7. La especificidad de la sonda para secuencias *nptII* se corroboró por comparación entre los controles positivos y negativos, observándose una diferencia significativa en el grado de hibridación de los controles positivos con respecto a los negativos. Es de observar que la hibridación con esta sonda no permite diferenciar entre deleciones totales del gen o deleciones internas en el área del gen sobre la cual anilla la sonda. Para la planta P7, a pesar de mostrar una hibridación *nptII* positiva, no fue posible apreciar la actividad del gen; de manera que en esta planta, si bien podrían existir secuencias *nptII*, estas no serian funcionales; un posible caso de silenciamiento o bien un caso de perdida parcial de zonas del gen no cubiertas por la sonda. La pérdida de las secuencias *nptII* en plantas transgénicas ha sido reportado con anterioridad en otras especies transgénicas (Kim et. al., 1.998), que reporta porcentajes de pérdida de 10-30% en zanahoria y 40-60% en patilla transgénica a *nptII*. Asimismo, en tabaco transgenico se ha reportado cierta tendencia a la pérdida de *nptII* (Gheysen, 1.990;

De Groot et. al, 1.994). De manera que en lechosa el caso estudiado en este trabajo correspondería a un caso similar a los reportados de pérdida de secuencias del marcador *nptII*.

Los parámetros evaluados en este trabajo, fueron también evaluados por Fermin G, (Comunicación personal). Quien ensayó una muestra de plantulas obtenidas a partir de la misma semilla de donde se obtuvieron las plantas empleadas en este trabajo. Al respecto obtuvo los siguientes resultados: pérdida de la resistencia a Km, no fue posible detectar el gen *nptII* por PCR, y si detecta por PCR al gen *cp*. Estos resultados que a excepción de los resultados de PCR para *cp*, son concordantes con los obtenidos en este trabajo.

CONCLUSIONES

En las condiciones ambientales en las cuales fueron cultivados y mantenidas las plantas de la muestra estudiada, el gen *cp* tiende a mantenerse incorporado al genoma de las plantas que lo reciben. Es también estable en cuanto a su expresión, encontrándose que más de 90% de las plantas que reciben secuencia presentaron resistencia al PRV. El gen *nptII* mostró gran inestabilidad, originada principalmente por pérdidas de sus secuencias y posiblemente por la inserción de copias no funcionales. En la práctica para ninguna de las plantas de la muestra pudo observarse una actividad mantenida de la actividad de este gen. De manera que no pueden establecerse correlaciones entre la actividad del reportero *nptII* con la presencia o actividad del marcador *cp* y, por lo tanto, las determinaciones de la proteína NPTII o de resistencia a Km no fueron aptas para estimar la presencia de *cp* en plantas o predecir el posible fenotipo de resistencia a virus.

Las técnica de hibridación " dot blotting " con sondas de dioxigenina marcadas por "Random primer", resulto ser adecuada para la detección específica de las secuencias de los transgenes en el genoma de plantas. Dado que se observó correlación entre la resistencia a virus y la presencia de copias del gen *cp* en plantas resistentes; al menos en las condiciones ambientales y de manejo a la cuales estuvieron sometidas las plantas durante este experimento, la técnica de " dot blotting " permitiría predecir el fenotipo de resistencia a virus.

Con la pareja de "primer" empleadas por medio de la técnica convencional de PCR, no fue posible el estandarizar un procedimiento para la detección de *cp*.

BIBLIOGRAFÍA

- An, G.** (1.987) Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed cells. *Plant Physiol.* 81: 86-91.
- An, G., Costa, M. A. and Ha, B.** (1.990) Nopaline synthase promoter is wound inducible and auxin inducible. *Plant Cell.* 2 (3) 255-233.
- Andrejeva, J., Puurand, U., Merits, A., Rabenstein, F., Jarvakulg, L. and Valkonen, J.** (1.999) Potyvirus helper-component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus-host interactions and the same CP motif effects virus transmission and accumulation. *Journal of General Virology*, 80: 1133-1139.
- Beachy, R.N.** (1.993). Virus resistance through expression of coat protein genes in: *Biothenology in plant disease wiley-liss* pp 89-104.
- Beachy, R.N** (1.999) Coat protein mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philos. Trans. R Soc. Lon. Biol .Sci.*29, 354 (1383): 659-664.
- Bi O 112 virology.** (1.999) Lectura 2 viral entry and uncoating PartI.www.biology.uc.sc.edu/classes/bio112/lecture2.html
- Briceño, A.** (1.998) Clonamiento y Análisis Molecular del Gen de la proteína de la Capsidie (CP) de Variantes Geográficas del Virus de la Mancha anular de la lechosa (PRV). Tesis de Pregrado Universidad de los Andes.
- Bustamante, P., Hull, R.** (1.998) Plant virus gene expression strategies .*Plant Biotechnology*.Vol 1N 2 Issue of August 15.Republicado on line <http://www.ejb.org/content/vol1/issue2/full/3/>

- Carrington, J. C and Freed D.** (1.990) Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' non translated region. *Journal of Virology*, 64 (4): 1590-1595.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E. and Schaad M.C.** (1.998) Genetic evidense for an essential role of potyvirus CI protein in cell- to- cell movement. *Plant Journal*, 14 (14): 393-400.
- Carrington, J.C. Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. and Schaad, M.C.** (1.996) Cell to Cell and long distanse transport virus in plants .*The Plant Cell*, 8: 1669-1681.
- Chee, P. and Slightom, L.** (1.992) Transformation of *Cucumber* tissues by microprojectible bombardment identification of plants containing functional and nonfuctional transfer genes. *Gene*, 118 (2): 255-260.
- Cheng, Y. H. and Yet, S. D.** (2.000) Construction and evaluation of transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of papaya ringspot virus with different translation leaders. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 41: 1-10.
- Confalonieri, M., Balestrazzi, C. and Bisoffi, S.** (1.994) Genetic transformation of *Populus nigra* by *A tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 13(5): 256-261.
- Dagert, M.** (1.999) Obtención de plantas transgénicas de *Carica papaya* resistentes al virus de la mancha anular PRSV. Trabajo de ascenso para optar a la categoría de profesor titular. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Dale, P.J., Al-Kaff, N., Bavage, A., Irwin, J. and Senior, I.** (1.998) Transgene expression and statability in *Brassica*. *Acta Horticulturae*, 459: 167-171.
- Daros, J. A., Schaad, M. C. and Carrington, J. C.** (1.999). Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco

etch potyvirus ,using conditional and suppressor mutants. *Journal of Virology*,73(10):8732-8740.

De Block, M. (1.993) The biology of plant transformation , current state problems prospects and implications for plant breeding. *Euphytica*, 71: 1-14.

Dehio, C. and Schell, J. (1.994) Identification of plant genetic loci involved in a post transcriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc Natl .Acad.Sci.USA*, 91: 5538-5542.

Delaney, T., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D. Gaffney, T. Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. and Ryals, J. (1.994) A central role of Salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266: 1247-1249.

De Groot, M. J., Offringa, M. R., Groet, J., Does, M. P., Hooykaas, P. J. and Van den Elzen, P. M. (1.994). Non-recombinant in gene targeting: illegitimate recombination between a *hpt* gene and defective 5' deleted *nptII* gene can restore a Km phenotype in tobacco. *Plant Molecular Biology* 25:721-733.

Dinant, S., Blaise, C., Kusiak, C., Astier -Manificier, S. and Albouy, J. (1.993) Heterologus resistance to Potato Virus Y in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gen of Lettuce Mosaic Potyvirus. *Phytopatology*, 83:818-824.

Dougherty, W. and Carrington, J. C. (1.988) Expression and funtion of potyviral gene products *Annual Review of Phytopatology*, 26:123-143.

Dougeherty, W. G., Lindbo, J. A., Smith, H. A., Parks, T. D., Swaney, S. and Proebsting, W. M. (1.994) RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 7 (5): 552-554.

Enyedi, A., Yalpani, N., Silverman, P. and Rakin, I. (1.992) Localization and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 2480-2484.

Fagard, M., Boutet, S., Morel, J. B., Bellini, C. and Vauchert H. (2.000) AGO1 QDE-2 and RDE-1 are related proteins required for posttranscriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(21): 11650-11654.

Farinelli, L and Mainoë, P. (1.993) Coat protein gene mediated resistance to potato virus Y in tobacco: mechanisms -is the transgenic coat protein required for protection?. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 6(3): 284-292.

Fermín, G. (1.996) .Análisis molecular de las variantes geográficas del virus de la mancha anular de la lechosa PRV y clonaje in vivo de diversos constructos. Tesis de Maestría. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela.

Fermín, G. Comunicación personal. gaf5@cornell.edu

Fernández, P. J. .A. (2.000) Ingeniería Genética de Plantas. Publicación del Instituto de Desarrollo Regional. Universidad de Castilla-La Mancha Albacete. <http://seg.umh.es/lecciones/inggenplan.txt>

Finnegan, J. and Mac-elroy, D. (1.994) Transgene expression in plants. *Bio/technology*, 12: 883-888.

Fitch, J. and Beachy, R. N. (1.993). Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annual Review of Microbiology* 47:739-763

Fuchs, M., Ferreira, S. and Gonsalves, D. (1997). Management of virus diseases by classical and engineered protection. *Molecular Plant Pathology*.
OnLine.<http://www.bspp.org.uk/mppo//1997/0116fuchs>

Futchs, M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., Slightom, J.L., Sanford, J.C. (1992).
Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology*, 10: 1466-1472.

Gheysen, G., Herman, L., Breine, P., Giellen, J., Van Montagu, M. and Depicker, A.
(1990). Cloning and sequence analysis of truncated T-DNA inserts from *Nicotiana tabacum*. *Gene*, 94 : 155-163.

Grumet, R. (1995). Coat protein -mediated virus resistance in plants.
<http://www.aibs.org/bioscience library /vo 146/transgenic /virus .html>.

Gonsalves, D., Chee, P., Provvidenti, R., Seem, R. and Slightom, J.L. (1992).
Comparison of coat protein-mediated and genetically-derived resistance in cucumbers to infection by cucumber mosaic virus under field conditions with natural challenge inoculations by vectors. *Bio/Technology*, 10: 1562-1570.

Goodwind, J., Chapman K., Swaney S., Parks D., Wernsman, E. A and Dougherty, G. W. (1996). Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA- mediated virus resistance. *The Plant Cell*, (8): 95-105.

Hall, L.M., Taylor, K. B. and Jones, D.D. (1993) Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 124: 75-81.

Hiraga, S., Ito, H., Sasaki, K., Yamakawa, H., Mitsuhara, I., Matsui, H. Honma, M and Ohashi, Y. (2.000). Wound-induced expression of a tobacco peroxidase is not enhanced by ethephon and suppressed by methyl jasmonate and coronatine. *Plant Cell Physiol*.41 (12):165-170.

Horsch, R. B., Fraley, R. T., Sanders, P. R. and Hoffmann, N. (1.984).Inheritance of functional foreign genes. *Plant Science*, 223: 496-498.

Ingelbrecht, I., Van Houdt, H., Van Montagu, M. and Depicker, A. (1.999) .Post transcriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91(22) : 10502-10506.

Ingelbrecht, I., Irvine, J.E., Mirkov, T. E. (1.999). Post transcriptional gene silencing in transgenic sugarcane dissection of homology-dependent virus resistance in monocot that has complex polyploid genome. *Plant Physiology*, 119(4): 1187-98.

Jongedijk, E., de Schutter, A., Stolte, T., van den Elzen, P. and Cornelissen, B. (1992). Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Bio/Technology*, 10: 422-429.

Kachroo, P., Yoshioka, K, Shah, J., Dooner, H. and Klessing, D. (2.000) Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent and NPR1, ethylene and jasmonate independent. *Plant Cell*, 12(5): 677-690.

Kasschau, K. D., Cronin, S. and Carrington J. C. (1.997) Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch virus helper-component-proteinase. *Virology*, 228(2): 251-262.

Kasschau, K. D. and Carrington. J C. (1.998). A counter defensive strategy of plant viruses suppression of post transcriptional gene silencing. *Cell*, 95(4): 461-470.

Kenn, N. T. (1.992). The molecular biology of disease resistance. *Plant Molecular Biology*, 1: 109-122.

Kim, S. R., Kim, Y. and An, G. (1.993) Identification of methyl jasmonate and salicylic acid response elements from the nopaline synthase (nos) promoter. *Plant Physiol.* 103 (1): 97-103.

Kim, Y. S., Lee, M. H., Min, S. R.; Yoo, O.J., Liu, J.R. (1.998) Frequent occurrence of transgene deletion in transgenic plants. *Mol Cells.* 8 (6) 705-708.

Kiraly, Z., Barna, B. and Ersek, T. (1.972) Hypersensitivity as a consequence, not the cause, of plant resistance to infection. *Nature*, 239: 450-457.

Kuhlemeier, C. and Zsitlin, M. (1.992. Transcriptional and posttranscriptional regulation of gene expression in plant.. *Plant Molecular Biology*, 19:1-14.

Lamb, C. (1.994) Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell*, 76:419-422.

Langerberg, W. G., Zhang, G. L. 1.997. Immunocytology shows the presence of Tobacco Etch Virus P3 protein in nuclear inclusion. *Journal of Structural Biology*, 118 (3): 243-247.

Leonald, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G. and Labierte, J. (2.000) Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*, 74 (17): 7730-7737.

Llave, C., Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. (2.000) Virus encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets maintenance setp in the silencing pathway. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* 97 (24): 13401-13406.

- Maln e, P., Farinelli, L., Collet, G.F., Reust, W. (1994)** Small-scale field tests with transgenic potato, cv. Bintje, to test resistance to primary and secondary infections with potato virus Y. *Plant Molecular Biology*, 25, 963-975.
- Martin MT and Gellie P. (1.997)** . Non structural plum pox potyvirus proteins detected by immunogold labeling . *European Journal of Plant Pathology* 103,431-437.
- Martin, M.T., Cervera, M. T., Garcia, J. A. and Bonay, P. (1.995)** Properties of the active Plum Pox Potyvirus RNA complex in defined glycerol gradients fractions. *Virus Research*, 37(2): 127-137.
- Marathe, R., Anandalakshmi, R., Smith, T. H., Pruss, G. J. and Vance, V. B. (2.000)** RNA Viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology*, 43 (2-3): 295-306.
- Matzke M. A., Matzke A. J. A and Engleston, W. B (1.996)** . Paramutation and transgene silencing a common response to invasive DNA. *Trends Plant Science*, 1:382-388.
- Matzke, M.A., Mette, M.F. and Matzke, A. J. (2.000)** Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Molecular Biology*, 42(2-3):401-405.
- Mayda, E., Marques., C., Conejero V. and Vera P. (2.000)** Expression of pathogen-induced gene can be mimicked by auxin insensitivity. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 13 (1) : 23-31.
- Mazodier, O., Cossart, P., Giraud, E. and Gasser, F. (1.985)** Completion of the nucleotide sequence of the central region of Tn5 confirms the presence of three resistance genes. *Nucleic Acid Res.* 13: 195-205.

Meins, F. (2.000) RNA degradation and models for post- transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology*. 43: 261-273.

Merist, A., Guo, D., Jarvekulg, L. and Saarman M. (1.999) Biochemical and genetic evidence for interactions between Potato A Potyvirus encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology*, 263(1): 15-22.

Mette, M.F., Aufsatz, Z. W., van der Winden J., Matzke, M. A. and Matzke, A. J. (2.000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO Journal*, 19(19): 5194-5201.

Meyer, P. (1.996) Repeat induced gene silencing common mechanisms in plants and fungi. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 377(2) 87-95.

Morel, J. B. and Tefer, M. (2.000) Are there potential risks associated with use on Cauliflower mosaic virus 35 S promoter in transgenic plant?.[http:// www.agbios .com / articles/2000_165_Ahtm](http://www.agbios.com/articles/2000_165_Ahtm).

Molecular Genetics Protocols [.http://www.spb.wau.nl/genetics/labweb/protocol.htm](http://www.spb.wau.nl/genetics/labweb/protocol.htm) .

Morel, J.B and Vaucheret, H. 2.000. Post-transcriptional gene silencing mutants. *Plant Molecular Biology*, 43(2-3): 275-84.

Munger, H.M. 1993. Breeding for viral disease resistance in cucurbits. In: Kyle MM (ed)Resistance to viral diseases of vegetables: genetics and breeding Timber Press Oregon, pp44-60.

Nelson, R.S, McCormick, S.M., Delannay, X., Dube, P., Layton, J., Anderson E.J., Kaniewska, M., Proksch, R.K., Horsch, R.B., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Beachy, R.N. (1.988) Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic

tomato plants expressing coat protein from tobaccomosaic virus. *Bio/Technology*, 6: 403-409.

Niepel, M and Gallie, P. (1.999). Identification and characterization of functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap independent translation. *Journal of Virology*, 73(11)9080-9088.

Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., Ohashi, Y. (1998). Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.*, 39: 500-507

Plant Viruses On Line (2.000) <http://www.im.ac.cm/vide/descry 334. htm>

Purcifull, D. E., Edwarson, J., Hierbert, E.; and Gonsalves, D (1.984). Papaya ringspot virus (revised), N. 292 in: *Description of plant viruses. Common. Mycol. Imst/ Assoc. Appl. Biol, Kew, Surrey, England*

Rajamaki, M.L. and Valkonen, J. P. (1.999). The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicotiana glauca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12 (12):1074-1081.

Reimann, P. U. (1.998). Mechanisms of resistance. Expression of coat protein. *Methods Mol Biol.* 81 521-532.

Ren, T., Qu, F. and Morris, T.J. (2.000). HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell*, 12(10): 1917-1926.

Riechmann, J., Lain, S. and Garcia, J. (1.992) Highlights and Prospects of Potyvirus Molecular Biology. *Journal of General Virology*, 73: 1-16.

- Risseuw, E., Franke vanDijk, M.E. and Hooykaas. P. J.** (1.997) Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome. *Plant Journal*, 11(4): 717-728.
- Robertson, N. L., French, R. and Gray, S. M.** (1.991) Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *Journal of General Virology*, 72: 1473-1477.
- Roberts, I.M., Wang D., Findlay K. and Maule., A. J.** (1.998) Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI proteins acts transiently in aiding virus movement. *Virology*, 245(1): 173-181.
- Rubino, L., Capriotti, R. L. and Russo, M.** (1.993) Resistance to cymbidium ringspot tomosvirus infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing the virus coat protein gene. *Plant Molecular Biology*, 21: 665-672.
- Russell, S. H., Hoopes, J.L. and Odell, J. T.** (1.992) Directed excision of a transgene from plant genome. *Molecular and General Genetic* 234(1): 49-59.
- Ryals, J., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Sleiner, H. Y. and Hunt, M.** (1.996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Journal*, 8: 1809-1819.
- Rybicki, E.** (2.000) RNA Plant and Animal Virus Replication. <http://www.uct.ac.za/microbiology/tutorial/RNA%20virus%20replication.htm>
- Sambrot, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1.989) MOLECULAR CLONING Laboratory Manual .Segunda Edicion . Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, P.R., Sammons, B., Kaniewski, W., Haley, L., Layton, J., Lavalley, B.J., Delannay, X., Tumer, N.E.** (1992). Field resistance of transgenic tomatoes

expressing the tobacco mosaic virus and tomato mosaic virus coat protein genes. *Phytopathology*, 82: 683-690.

Schaad, M. C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S. and Carrington J. C. (1.996) Analysis of VPg -polymerase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing and genome amplification. *Journal of Virology*, 70 (10): 7039-7048.

Schaad, M.C., Jensen, P.E. and Carrington J. C. (1.997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum targeted viral protein. *EMBO*: 16(13): 4049-4059.

Siegrist J; Orober, M. and Buchenauer, H. (2.000) beta-aminobutyric acid mediated enhancement of resistance in tobacco mosaic virus depends on accumulation of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(3): 95-106.

Simon-Buela, L., Guo, H. S. and Garcia, J. A. (1.997). Cap independent leaky scanning as the mechanism of translation initiation of plant viral genomic RNA. *Journal of General Virology*, 78 (10): 2691-2699.

Silva, H., Yoshioka, K, Dooner., H. K. and Klessing, D. F. (1.999) Characterization of new *Arabidopsis* mutant exhibiting enhanced disease resistance. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 12 (12): 1053-1063.

Smalla, K., Borin, S., Heuer, H., Gebhard, F., Van Elsas, J. D and Nielsen, K. (2.000) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria -are there-new data to fuel the debate. Proceedings of the 6th International Symposium on THE BIOSAFETY OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS, July 2000, p. 146-154, Saskatoon, Canada, Clare Fairbairn, Graham Scoles and Alan Mc -Hughen, University Extension Press, Saskatchewan ISBN0-88880-412-1.

Smith, H. A., Swaney, S. L., Parks, T. D., Wernsman, E.A. and Dougherty, W. G.(1.994)
Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs:Expression,regulation,and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell*, 6: 1441-1453.

Staskawicz, B., Ausubel, F., Baker, B., Ellis J and Jones, J. (1.995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268:661-667.

Taiz L-Zeiger, E. (1.998) Plant Physiology. Second Edition Sinauer Associates ,Inc ,publishers Sunderland Massachusetts.pp347-374.

Tennant, P. F., Gonsalves, C., Ling, K. S., Fitch, M., Manshardt, J. L., Slighton, J. L., and Gonsalves, D. (1.994) Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein transgenic papaya and classically cross protected papaya.*Phytopalogy*, 84: 1359-1366.

Thomashow, M.F., Panago, P. C., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1.980) Host Range of *Agrobacterium tumefaciens* is determined by the Ti plasmid. *Nature*, 283: 794-796.

Thompson, J. and Burdon, J. (1.992) Gene for gene coevolution between plants and parasites. *Nature*, 360:121-125.

Van Bloklandt, R., Ten-Lohuis, M. and Meyer, P. (1.997) Condensation of chromatin in transcriptional regions an evidence for an active role of transcription in gene. *Molecular and General Genetic*, 257(1): 1-13.

Van Wees, S. C., De Swart, E.A., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C. and Pieterse, C. M.
(2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Arac. Natl. Acad. Sci. USA*. 97(15): 8193-8716.

Virus Uncoating. (2.000) <http://athena.bioc.uvic.ca/bioc/courses/402/402.9a.html>

- Voinnet, O., Pinto, Y. M. and Baulcombe, D. C. (1.999)** Suppression of gene silencing a general strategy used by diverse DNA and RNA virus plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(24): 14147-1415.
- Wang, X., Ullah, Z. and Grumet, R. (2.000)** Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA -dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology*, 275(2):433-443.
- Ward, E. R., Unes, S. J., Williams, S C. Dicher SS and Wiederhold, A. (1.991)** Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 3 1085-1094.
- Ward, C.W. and Shukla, D.D. (1.991)** Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology*, 32: 269-296
- Wassenegger, M. and Péliissier, T. (1.998)** A model for RNA-mediated gene silencing in higher plant. *Plant Molecular Biology*, 37:349-362.
- Watson, B., Currier, T. C., Gordon, M. P., Chilton, M. D. and Nester, E. W. (1.975).** Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. 123: 255-264.
- Weide, R., Koornneef, M. and Zabel, P . (1.989)** A simple non destructive spraying assay for detection gene in transgenic plants. *Theoretical Applied Genetic*. 78: 169-172.
- Wetzel, T., Candresse, M., Ravelonandro, M. and Dunez, J. (1.991).** A Poly Chain Reaction assay Adapted to Plum Pox Potyvirus Detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355-365.
- Winterhalter, A. G. (2.000)** Potyvirus genome structure, organization, processing and possible function of mature protein. [http:// www. uq. edu. au/udu/potygen. htm](http://www.uq.edu.au/udu/potygen.htm).

Wu-Scharf, D., Jeong, B., Zhang, C. and Cerutti, H. (2.000) Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-BOX RNA helicase. *Science*, 290(5494): 1159-63.

Xiong, Z. 2.000). Cell to Cell and Long Distance Movement of Plant Viruses. <http://ag.arizona.edu/~zxiong/plp611/lect11.html>

Xiong, Z. (2.000) (b). VIRAL GENES INVOLVED IN VECTOR TRANSMISSION <http://search.yahoo.com/bin/search?p=Xiong+and+viral+genes+and+involved>

Ye, F. and Signer, R.I. (1.996).(Repeted -induced gene silencing) in *Arabidopsis* transcriptional and alter chromatin configuration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:10881-10886.

Yusibov, V. and Loesch-Fries, L. S. (1.995). High affinity RNA binding domains of alfalfa mosaic virus coat protein are not required for coat protein-mediated resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (19): 8980:8984.

Anexos

Anexo1. Medios de cultivo

Medio Lauria Bertani (MLC)

Cloruro de sodio	10,0 g
Extracto de Levadura	5,0 g
Triptona	10,0 g
Agua,c.s.p	1.000 cc

Anexo 2. Soluciones

1. Solución para la inoculación de plantas.

Fosfato de potasio	0,01M,(pH,7)
Sulfito de sodio	0,1%
EDTA	0,01%

2. Soluciones para la extracción de AND genómico

2.1 Buffer de Extracción

Urea	7 M
NaCl	0,3 M
EDTA	20 mM
Tris-HCl(pH 8)	50 mM
laurilsarcosil.	1 %

2.2 Solución de ARNasa

ARNasa A	10 mg
Agua	1 ml

2.3 Buffer TE

Tris-Cl(pH 7,4)	10mM
EDTA	1mM

3. Soluciones para la extracción de ADN plasmídico

3.1 Solucion I

50mM de glucosa

25mM de Tris.Cl (pH8)

10Mm de EDTA (pH8)

3.2 Solución II

0,2 N de NaOH

1% de SDS

3.3 Solución III

5 M de acetato de potacio 60 ml

acido acetico glacial 11,5ml

agua 28,5ml

4. Soluciones para Hibridación

4.1 Solución Desnaturalizante

NaCl 1,5 M

NaOH 0,5 M

4.2 Solución Neutralizante

NaCl 1,5 M

Tris-HCl(pH7,4) 0,5 M

4.3 Solución SSC20X

Citrato de sodio (pH 7,0) 300 mM

NaCl 300 mM

4.4 Solución de prehibridización

SSC	5X
Blocking reagent	1%
Nlaurylsarcosina	0,1%
SDS	0,02%

4.5 Solución desnaturalizante ("dot blotting")

NaOH	4M
EDTA	100mM

4.6 "Genius buffer 1"

Tris HCl	100mM
NaCl	150mM
pH 7,5	

4.7 "Genius buffer 2"

" Genius 1 " mas 2% p/v de
Blocking reagent

4.8 "Genius Buffer 3"

Tris-HCl	100mM
NaCl	100mM
MgCl ₂	50mM (pH 9,5)

5. Soluciones para electroforesis

5.1 Buffer TBE 10X

Tris Base	1M
Acido bórico	0,83M
EDTA	10mM

5.2 Solución de bromuro de etidio

Bromuro de etidio	0,2 g
Agua	20ml

5.3 Buffer de carga

Orange /blue 6X

6. Soluciones para ELISA

6.1 Buffer PBS pH 7.4

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g
KCl	0,2 g
NaN ₃	0,2 %
H ₂ O	1L

6.2 Buffer de lavado

PBS ,pero con 0,5 ml de Tween-20
por litro
Buffer de extraccion
PBS mas 2% en PVP

6.3 Buffer de recubrimiento

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
NaN ₃	0,20 g
H ₂ O	1 L

Ajustar a pH 9,6 con HCl

6.4 Buffer de conjugación

PBS mas 2% dePVP,
y 0,2% de ovoalbumina

6.5 Buffer Sustrato

Dietanolamina	97 ml
NaN ₃	0,2 g
H ₂ O	1 L

6.6 PMSF

"Stock" 1,74 mg/ml en
Isopropanol.40µg/ml
concentración final

